



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO
ACUOSO DE *TURNERA DIFFUSA* WILLD
EN RATAS MACHO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TANIA ESPINOSA FRAGOSO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA

(2015)

México, D.F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Espinosa
Fragoso
Tania
55825626
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
305049391

2. Datos del tutor

Dra.
Lucía Alba
Martínez
Mota

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Adolfo
Andrade
Cetto

4. Datos del sinodal 2

Dr.
José Jaime
Herrera
Pérez

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Rosa
Estrada
Reyes

6. Datos del sinodal 4

Bióloga
Rita Virginia
Arenas
Rosas



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Efecto ansiolítico del extracto acuoso de Turnera diffusa Willd en ratas macho.

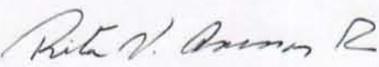
realizado por **ESPINOSA FRAGOSO TANIA** con número de cuenta **3-0504939-1** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Adolfo Andrade Cetto 

Propietario Dr. José Jaime Herrera Pérez 

Propietario Dra. Lucia Alba Martínez Mota 
Tutora

Suplente M. en C. Rosa Estrada Reyes 

Suplente Biól. Rita Virginia Arenas Rosas 

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "

Ciudad Universitaria, D. F., a 03 de noviembre de 2015
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/MGM/mdm 

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Conductual del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, bajo la dirección de la Dra. Lucía Martínez Mota y la asesoría técnica del Sr. Sergio Márquez Baltazar.

T.E.F recibió una beca del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) del INPRF.

Agradecimientos

A la Dra. Lucy por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A los miembros del jurado que revisó mi tesis, el Dr. Adolfo Andrade Cetto, el Dr. Jaime Herrera, la Dra. Rosa Estrada y la maestra Rita Virginia Arenas por haberse tomado el tiempo de revisar este trabajo y aportar sus valiosos comentarios y conocimientos.

A Sergio Márquez por su gran apoyo en la parte experimental y teórica. A Diana Alethia Guerrero no solo por su ayuda en los experimentos, también por su apoyo incondicional. A mis compañeras y compañeros del laboratorio por su apoyo.

Índice

	Página
1. Resumen	1
Índice de abreviatura.....	2
Índice de figuras.....	3
Índice de tablas.....	4
2. Introducción	5
2.1 <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult	5
2.1.1 Descripción botánica.....	5
2.1.2 Distribución.....	7
2.1.3 Uso medicinal de <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.....	8
2.1.4 Vinculo del uso de <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult. en la medicina tradicional como calmante de nervios con la ansiedad.....	9
2.1.5 Estudios sobre <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult	10
2.1.6 Efectos de <i>Turnera diffusa</i> en la conducta sexual y la ansiedad.....	10
2.1.7 Estudios fitoquímicos de <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult..	11
2.2 Ansiedad.....	14
2.2.1 Definición de ansiedad.....	14
2.2.2 Miedo y ansiedad.....	14
2.2.3 Ansiedad como un trastorno.....	15
2.2.4 Desorden de ansiedad generalizada (DAG) y agorafobia.....	17
2.2.5 Etiología de la ansiedad.....	18
2.2.6 Tratamientos farmacológicos para los trastornos de ansiedad.....	19
2.3 Sistema GABAérgico.....	21
2.3.1 GABA en el SNC.....	21
2.3.2 Receptores a GABA.....	22
2.3.3 Receptor GABA _A	23
2.3.4 GABA en ansiedad.....	24
2.4 Otros neurotransmisores relacionados con la ansiedad.....	26
2.4.1 Noradrenalina y serotonina.....	26

2.5	Neurobiología de la ansiedad.....	26
2.6	Modelos animales de ansiedad.....	30
2.6.1	Modelos condicionados y modelos no condicionados.....	31
2.6.2	Prueba de enterramiento defensivo.....	32
2.6.3	Prueba de laberinto elevado en cruz.....	35
2.7	Modelos animales en la fitofarmacología.....	36
3.	Planteamiento del problema.....	38
4.	Hipótesis.....	38
5.	Objetivo.....	39
5.1	Objetivo general.....	39
5.2	Objetivos particulares.....	39
6.	Material y métodos.....	40
6.1	Sujetos experimentales.....	40
6.2	Preparación del extracto acuoso de <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult.....	40
6.3	Fármacos.....	41
6.4	Diseño experimental.....	41
6.4.1	Experimento 1.....	41
6.4.2	Experimento 2.....	42
6.4.3	Experimento 3.....	44
6.5	Pruebas conductuales.....	45
6.5.1	Prueba de laberinto elevado en cruz.....	45
6.5.2	Prueba de laberinto enterramiento defensivo.....	47
6.5.3	Prueba de actividad motriz.....	48
6.6	Análisis estadístico.....	49
7.	Resultados.....	50
7.1	Prueba de enterramiento defensivo.....	50
7.1.1	Experimento 1.....	50
7.1.1	Experimento 2.....	51
7.1.1	Experimento 3.....	52
7.2	Prueba de laberinto elevado en cruz.....	54
7.2.1	Experimento 1.....	54
7.2.2	Experimento 2.....	55

7.2.3 Experimento 3.....	56
8. Discusión.....	58
8.1 Modelos animales para el estudio de la ansiedad.....	58
8.2 El extracto acuoso de <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult produce efectos ansiolíticos en dos modelos de ansiedad.....	59
8.3 El extracto acuoso de <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult produce efectos bifásicos en dos modelos de ansiedad.....	60
8.4 La vía GABAérgica participa en el efecto ansiolítico del extracto acuoso de <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult.....	61
8.5 Diferencias en el efecto farmacológico entre diazepam y el extracto.....	64
8.6 Efecto de metabolitos de <i>Turnera diffusa</i> Willd ex. Schult...	65
8.7 Diferencias de acuerdo al modelo animal de ansiedad.....	67
9. Conclusiones.....	71
10. Perspectivas.....	71
11. Referencias.....	72

1. Resumen

Turnera diffusa Willd. ex Schult. (Turneraceae) es un arbusto con una alta distribución en México, es conocida tradicionalmente como Damiana de California. En la medicina tradicional, la Damiana se utiliza para atender la impotencia sexual y para calmar los nervios. Sin embargo, es necesario realizar investigación científica para verificar si *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. produce efectos ansiolíticos, así como elucidar el mecanismo de acción para tales acciones farmacológicas. El objetivo del estudio fue determinar si un extracto acuoso de *Turnera diffusa* produce efectos ansiolíticos en ratas macho Wistar en dos modelos de ansiedad, y si los receptores GABA_A están involucrados en este efecto. Los grupos independientes de ratas macho adultas fueron asignadas a los siguientes tratamientos: a) extracto acuoso de *Turnera diffusa* (0, 5, 10, 20, 40 y 80 mg/kg, p.o.), b) al fármaco de referencia, diazepam (2 mg/kg, i.p.), c) el antagonista del receptor GABA_A, picrotoxina (0.5, 1, 1.5 mg/kg, i.p.), y d) la combinación de la dosis efectiva del extracto de *Turnera*, más picrotoxina. El efecto de los tratamientos se evaluó en las pruebas de enterramiento defensivo (ED) y laberinto elevado en cruz (LEC). Además se estudió el efecto de los tratamientos sobre la actividad locomotriz en una prueba de campo abierto. En comparación con el grupo tratado con vehículo (grupo control), el extracto acuoso de *Turnera diffusa* produjo efectos ansiolíticos en las prueba de ED (5 y 10 mg/kg) y LEC (40 mg/kg), sin modificar la actividad ambulatoria. El efecto ansiolítico del extracto acuoso fue similar al inducido por el fármaco de referencia diazepam, aunque el extracto fue menos potente. El tratamiento con picrotoxina (1 y 1.5 mg/kg) bloqueó completamente el efecto ansiolítico del extracto en los modelos utilizados. Los resultados sugieren que los receptores GABA_A participan en el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

Índice de abreviaturas

ED	Enterramiento defensivo
LEC	Laberinto elevado en cruz
DAG	Desorden de ansiedad generalizada
DP	Desorden de pánico
AG	Agorafobia
DEPT	Desorden de estrés postraumático
DAS	Desorden de ansiedad social
DOC	Desorden obsesivo compulsivo
HHA	Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
SGP	Sustancia gris periacueductal
SNC	Sistema nervioso central
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina

Índice de figuras

Número	Descripción	Página
Figura 1a	Características de <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult. en su hábitat	6
Figura 1b	Características botánicas detalladas de <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	6
Figura 2	Distribución de <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult. en México	7
Figura 3a	Estructura del receptor GABA _A	23
Figura 3b	Síntesis y liberación del neurotransmisor GABA _A	23
Figura 3c	Sitios de unión de picrotoxina, GABA y benzodiazepinas en el receptor GABA _A	23
Figura 4	Circuitos cerebrales implicados en miedo y ansiedad	29
Figura 5	Resumen del experimento 1	43
Figura 6	Resumen del experimento 2	43
Figura 7	Resumen del experimento 3	44
Figura 8	Aparato de laberinto elevado en cruz	46
Figura 9	Aparato de enterramiento defensivo	48
Figura 10	Resultados del experimento 1: Enterramiento defensivo	51
Figura 11	Resultados del experimento 3: Enterramiento defensivo	53
Figura 12	Resultados del experimento 1: Laberinto elevado en cruz	55
Figura 13	Resultados del experimento 3: Laberinto elevado en cruz	57

Índice de tablas

Número	Descripción	Página
Tabla 1	Componentes principales de diferentes extractos de <i>T. diffusa</i> Willd. ex Schult.	12-13
Tabla 2	Prevalencia, comorbilidad y distribución por género de los trastornos de ansiedad	16
Tabla 3	Principales criterios diagnósticos para ansiedad generalizada y agorafobia	17
Tabla 4	Principales medicamentos usados en los desórdenes de ansiedad	20
Tabla 5	Tratamientos para el desorden de ansiedad generalizada y fobia específica, así como para la prueba de enterramiento defensivo	34

2. Introducción

2.1. *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

2.1.1 Descripción botánica

Turnera diffusa Willd. ex Schult. es un arbusto de la familia Turneraceae. Otros nombres científicos con los que también se conoce son: *Turnera humifusa* Endl.; *Turnera aphrodisiaca* Ward; *Turnera pringlei* Rose (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>; <http://www.tropicos.org/Home.aspx>; Alvarado-Cárdenas, 2006) y *Turnera diffusa* var. *Aphrodisiaca* (Ward) Urb. (<http://www.tropicos.org/Home.aspx>).

Turnera diffusa Willd. ex Schult. varía entre 30 cm y 2 m de altura (ver figura 1A). El tallo es ramoso y ligeramente rojizo, las hojas son alternas de 1 a 2 cm de largo, cortamente pecioladas, olorosas, estipuladas, casi ovadas, con la base angosta y el borde toscamente aserrado o lamentado y con la superficie inferior cubierta de fino vello más o menos denso; las estípulas son lineares y cerdosas, provistas a veces de glandulitas accesorias. Las flores se producen en las axilas de las hojas con pedúnculos muy cortos o nulos; miden de 8 a 12 mm de largo y constan de un cáliz tubular, tomentoso; corola de cinco pétalos de color amarillento, cinco estambres adheridos a la parte superior del cáliz; ovario elíptico o arredondado, peloso con cinco estilos libres ramificado en su porción. El fruto es dehiscente con varias semillas ovado-oblongas, de superficie reticulada, algo encorvadas (ver figura 1B). En México el arbusto florece de julio a noviembre (Lara y Márquez, 1996).

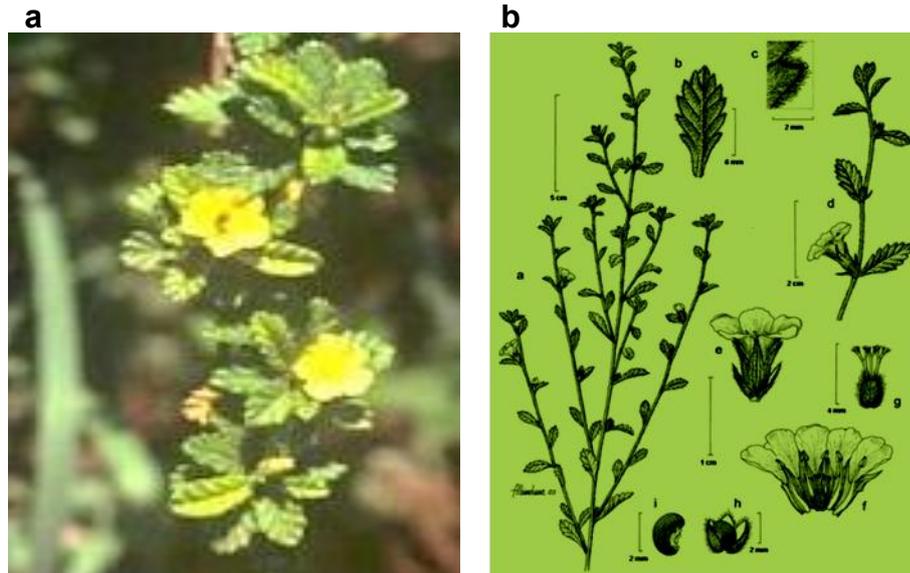


Figura 1. Imagen de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. que muestra en: A) las principales características de la planta en su hábitat) y B) las hojas, d) rama con flor, e) flor y brácteas, f) detalle de la flor abierta, g) gineceo, h) cápsula con semilla e i) semilla reticulada con arilo. A) Tomada de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.htm> y B) tomada de Alvarado-Cárdenas, 2006).

Turnera diffusa Willd. ex Schult. se supone originaria de Brasil (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>), aunque también se reporta originaria de México (Linares et al., 1999). Habita en climas semiseco y templado, entre los 1000 y los 2100 msnm. Está asociada a bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y bosque de encino. Es un arbusto silvestre, presente en terrenos de cultivo abandonados o cultivada en huertos familiares (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>), es también ampliamente cultivada para fines comerciales, pues es una de las principales plantas medicinales consumidas y vendida en el mercado en México (Linares et al., 1999) principalmente empleada como aromatizante y saborizante en la fabricación de licores, o bien, es consumida como simple té (Calderón de Rzedowski, 1999). Además esta planta se exporta en cantidades enormes a todo el mundo, sobre todo a los Estados Unidos (Rätsch, 2011).

Actualmente en México se conoce a este arbusto popularmente con diversos nombres: damiana amarilla, damiana americana, damiana de California, garañona, hierba de la mora, hierba de la pastora, hierba del venado, itamo real, jícamo real, mezquitillo, oreja de venado, paraleña, pastorcita, San Nicolás, y como *ajkits*, *misibkook*, *xmisibkok* en el estado de Yucatán (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>).

2.1.2 Distribución

Turnera diffusa Willd. ex Schult. se distribuye desde el sur de Estados Unidos (California y Texas) hasta el norte de Sudamérica (Brasil y Bolivia, incluyendo las Antillas). En México (ver Figura 2) se encuentra en los estados de Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Alvarado-Cárdenas, 2006).



Figura 2. Distribución de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en México, de acuerdo con Alvarado-Cárdenas, 2006.

2.1.3 Uso medicinal de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

Para los antiguos mayas, y en general en todo el México antiguo, la hierba de la Damiana era una de las plantas curativas más importantes. Los mayas conocen a esta hierba como *mis kok*, que significa “escoba del asma”, nombre que alude a uno de sus efectos curativos, pues además de curar las molestias corporales provocadas por el asma, favorece la irrigación del bajo vientre y estimula el deseo sexual. En un recetario de Yucatán, conocido popularmente como el *Libro del judío*, se menciona que la decocción de esta planta es un remedio imprescindible para la tos, ronquera, asma, catarro crónico y todas las otras enfermedades de las vías respiratorias. Además se menciona que es buena contra la debilidad cerebral (*sic*), la impotencia y la inflamación de los testículos (Rätsch, 2011).

Aunque en el siglo XX Alfonso Herrera indica que la damiana parece ser sólo un tónico muy débil, posteriormente Maximino Martínez la refiere como afrodisíaca, y para uso en múltiples alteraciones del sistema reproductivo y como antidiabética. Por su parte, Luis Cabrera señala su uso en alteraciones gástricas mientras que la Sociedad Farmacéutica de México la reporta como catártica y estimulante (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>).

Su uso medicinal en la República Mexicana y en algunos países de Centro y Sudamérica ha sido amplio y variado. En reportes de la medicina tradicional mexicana se indica para problemas variados de tipo ginecológico y sexual; sin embargo, el padecimiento en que más se emplea es la tos, bebiendo el vino vegetal (Guanajuato); o el té de las ramas con hojas el cual se ingiere caliente varias veces al día (Baja California Sur) (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>).

Otros usos que se le confieren son contra el dolor de estómago, para el catarro y el pulmón contaminado por tabaquismo, en la debilidad muscular y general. También se aprovecha en picadura de escorpión, reumas, diabetes, inflamación de la vejiga y en nefritis; así como para estimular el apetito y reforzar la sangre (*sic*) (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>), así como diurética y laxante (Gama et al., 1985). Otros usos reportados son el consumo de este arbusto como tónico y para calmar los nervios (Lara y Márquez, 1996; Gama et al., 1985) e incluso se ha empleado como sucedáneo de marihuana (Schultes et al., 2000).

2.1.4 Vinculo del uso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en la medicina tradicional como calmante de nervios con la Ansiedad

El término *nervios* refleja malestar entre los grupos latinos de Estados Unidos y Latinoamérica.

Los *nervios* se refieren tanto a un estado de vulnerabilidad frente a experiencias de estrés cotidiano como a un síndrome producido por circunstancias difíciles en la vida. El término *nervios* incluye una amplia variedad de síntomas de malestar emocional, alteración somática e incapacidad para la actividad. Los síntomas más frecuentes son cefaleas y “dolor cerebral”, irritabilidad, alteraciones gástricas, trastornos del sueño, nerviosismo, llanto fácil, dificultad para concentrarse, temblor, sensación de escalofríos y prurito, y *mareos* (inestabilidad con exacerbaciones ocasionales similares al vértigo). Los *nervios* tienden a ser un problema continuo, aunque variable en el grado de incapacidad que provoca.

Los *nervios* es un síndrome muy amplio, que va desde casos sin trastorno mental hasta cuadros que se parecen a diversos trastornos. Algunas condiciones relacionadas en el DSM-V son desorden depresivo mayor, desorden depresivo persistente, desorden de ansiedad generalizada, desorden de ansiedad social, otros desordenes disociativos específicos y no específicos, desordenes somatomorfos o psicóticos (DSM-V).

Debido a los síntomas parecidos de los *nervios* con los trastornos ansiosos y a que se relacionan con ansiedad generalizada y ansiedad social, según el DSM-V, se sugirió que *Turnera diffusa* Willd. ex. Schult. podría actuar como un ansiolítico, efecto que es comprobado en el presente trabajo.

2.1.5 Estudios sobre *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

A pesar de estos usos reportados en la medicina tradicional, existen pocos estudios científicos realizados de forma sistemática que hayan verificado las propiedades de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.; éstos son suficientes para identificar algunos efectos tanto periféricos como en el sistema nervioso central de conejos y roedores de laboratorio.

2.1.6 Efectos de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en la conducta sexual y la ansiedad

Se han descrito tres trabajos *in vivo* para comprobar las propiedades afrodisiacas que se le han atribuido a este arbusto en la medicina tradicional. Un primer estudio (Arletti et al., 1999) en roedores demostró que un extracto etanol-agua (1 ml/kg) de

Turnera diffusa Willd. ex Schult. facilitó la conducta sexual de ratas macho “sluggish”, es decir, ratas con una copula irregular y lenta, consideradas un modelo natural de disfunción sexual. Un estudio posterior de Estrada-Reyes et al., 2009 señaló que un extracto acuoso estandarizado de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. (ver tabla 1) a la dosis de 80 mg/kg, también revierte otra forma de inhibición sexual, la llamada “saciedad sexual”, fenómeno que aparece después de la cópula sostenida y al que subyace la reducción paulatina de la motivación sexual (Fernández-Guasti y Rodríguez-Manzo, 2003). Otro reporte reciente (Estrada-Reyes et al., 2013) señala un efecto pro-sexual de un extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. a 10 mg/kg en ratas “sluggish”, que se produce por un incremento de la vía del óxido nítrico, un mecanismo similar al del sildenafil (Estrada-Reyes et al., 2013).

En el estudio de Estrada-Reyes et al. (2013), se encontró que el efecto prosexual del extracto acuoso va acompañado de un efecto ansiolítico. Este experimento se realizó en la prueba de enterramiento defensivo, considerado un paradigma de ansiedad (De Boer, 2003). De acuerdo con el análisis fitoquímico, la presencia mayoritaria de flavonoides (ver tabla 1) podría ser responsable de tal actividad ansiolítica.

En el estudio de Kumar y Sharma, (2005), se realizó la evaluación de tres extractos obtenidos a partir de *Turnera afrodisiaca* y los disolventes éter, cloroformo y metanol. La evaluación en ratones incluyó un amplio rango de dosis (10-125 mg/kg) y la prueba se llevó a cabo en el laberinto elevado en cruz. Los autores reportaron que solo el extracto metanólico (25 mg/kg) produjo efectos ansiolíticos, posiblemente atribuidos a la presencia de flavonoides y alcaloides. En un estudio

adicional por Kumar et al. (2008) se comprobó que el flavonoide apigenina (2 mg/kg) aislado del extracto metanólico de las partes aéreas de esta planta, indujo un efecto ansiolítico en diferentes modelos de ansiedad. De forma interesante, este flavonoide también está presente en el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

2.1.7 Estudios fitoquímicos de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

Pocos son los estudios que se han realizado para determinar los compuestos químicos de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., estos se han llevado a cabo a partir de diferentes tipos de extracción con diversas partes de la planta (ver cuadro 1). Cabe destacar que de estos compuestos aislados e identificados en las diferentes formas de extracción destaca la presencia de flavonoides como apigenina y luteolina, el glucósido fenólico arbutina, glucósidos cianogénicos como tetrafilina B así como aceites esenciales como 1,8 cineol, además de cafeína, lo que podría explicar su efecto tonificante.

Tabla 1. Componentes principales de diferentes extractos de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

PARTE DEL ARBUSTO	EXTRACCIÓN	COMPUESTOS			REFERENCIAS
Hojas	No menciona	- Alfa y beta-pineno - Arbutina - Taninos	- Cafeína - Un aceite esencial - Tetrafilina B	- Resina - 1-8-cineol para-cimeno - Un principio amargo	Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana en: (http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/)
Ramas		- Gonzalistasina - Beta-sitosterol	- n-triacontano - Tricosan-2-ona	- Hexacosanol - Cafeína	
Hojas	No menciona	- Triacontan - β -sitosterol	- 5-hidroxi-7, 3',4'-Trimetoxiflavon	- gonzalitosin - hexacosano	Domínguez e Hinojosa, 1976 en Arletti et al., 1999.
Hojas	No menciona	- α y β -pineno - p-cimeno	- Resinas y taninos - 1,8 cineol	- Glucósidos cianogénicos - Glucósido hidroquinona	Steinegger y Hänsel, 1992 en Arletti et al., 1999.
Partes aéreas	Infusión	- Apigenina 7-8-glucosido - Apigenina 7-O-(6"-O-p-E-coumaroil)-glucosido	- Arbutina - Diosmetina 8-C-(2-O-ramnosil)-glucosido	- Luteolina 8-C-(2-O-ramnosil)-quinovosido	Piacente et al., 2002 en Szewczyc et al., 2014
Hojas, tallos y flores	Destilación, disolventes orgánicos	Aceites esenciales: - α y β -pineno - Limoneno - 1,8-Cineol - α -cubebeno - (+)-3-careno	- Cariofileno - Aloaaromadendreno - Myrtenal - δ -cadineno - (+)-Norinona - β -Elemeno	- γ - amorfeno - Verbenona - β -germacreno - γ -cadineno - Myrtenol - Oxido cariofileno	

		- Copaeno - Pinocarvaona	- Aristoleno	- (-) espatuleno	Alcaraz-Meléndez, 2004
Hojas	Metanólico	- Luteolina 8-C-E ácido propenoico - Siringetin - Laricitin - Equinacin - Equinaticin - Apigenina 7-O-β-D-glucosido - Metil β-fructofuranosido - Maltol 3-O-glucosido	- Tricin 7-O-β-D-glucosido - Acacetin - Acacetin 7-O-metil éter - Velutin - Pinocembrin - Teuhetenona A - Cariofileno epóxido - p-arbutina - Tetrafilina B	- Apigenina 7-O- (6"-O-p-Z- coumaroil β-D-glucopiranosido) - Luteolina 8-C-α-L-ramnopyranosil (1→2)-quinovopiranosido - Quercetin 3-O-{β-D-glucosil-(1→6)-β-D-glucosido} - Crisoeriol 7-O-β-glucosido - 4-O-β-D-glucopiranosil-p-ácido coumarico - Apigenina 7-O- (4"-O- p-Z- coumaroilglucosido)	Zhao et al., 2007
Partes aéreas	Acuoso	- Arbutina (hidroquinona-β-D-glucopiranosido), - Cafeína - Gluconato de sodio - 4'-dimetoxiflavona	- Apigenina - Damianina - Acacetina - Gonzalitozina - 5-OH	- Luteolin 8-C-16-deoxy-2-O-(α-L-ramnopyranosil)- xylo-hexopiranosido - Apigenina 7-O- (4"-O-p-Z-coumaroyl-β-D-glucopiranosido)	Estrada-Reyes et al., 2009

2.2 Ansiedad

2.2.1 Definición de ansiedad

La ansiedad es una estrategia adaptativa del organismo que consiste en un conjunto de cambios conductuales y vegetativos orientados a enfrentar de manera adecuada una situación amenazante o de peligro. La ansiedad también puede definirse como uno de los procesos cerebrales directamente involucrados en la sobrevivencia de diferentes especies animales, especialmente de aquellas que por su naturaleza son víctimas de los depredadores (Gómez et al., 2002).

2.2.2 Miedo y ansiedad

El miedo y la ansiedad se traslapan, pues tienen la misma función, sin embargo estos estados son diferentes. El miedo y la ansiedad expresan un rango de conductas adaptativas o defensivas ante una señal de daño, amenaza, o conflictos motivacionales, conductas que dependen del contexto y del repertorio de las especies. El miedo se centra sobre un daño o amenaza explícita inmediata, por lo que está más asociado a sobretensiones de excitación autonómica necesarias para la lucha o huida, mientras que la ansiedad es una respuesta generalizada que se desencadena ante una amenaza desconocida o menos explícita y más generalizada o por conflictos internos, por lo que está más asociada a tensión muscular y vigilancia con una preparación para un peligro futuro para desplegar conductas de evitación y precaución. A veces el nivel de miedo o ansiedad es reducido por conductas de evitación (DSM-V, 2013).

2.2.3 Ansiedad como un trastorno

La ansiedad es una reacción adaptativa normal pero puede llegar a ser patológica e interferir con la capacidad para enfrentar exitosamente los cambios y/o eventos estresantes, e incluso alterar la condición del cuerpo (por ejemplo, mediante la formación de úlceras gástricas). Los desórdenes de ansiedad se caracterizan por ser excesivos o persistentes (por ejemplo, perdurable típicamente por seis meses o más). Cada desorden de ansiedad es diagnosticado solamente cuando los síntomas no son atribuidos a los efectos de una sustancia, a una condición médica, o no son explicados por otro desorden mental. Además los desórdenes de ansiedad difieren unos de otros en los tipos de objetos o situaciones que inducen miedo, ansiedad, o conducta de evitación, y la ideación cognitiva asociada. Así, mientras los desórdenes de ansiedad tienden a ser altamente comórbidos, ellos pueden ser diferenciados por la sintomatología (ver tablas 4 y 5). La mayoría de los trastornos son más prevalentes en mujeres que en hombres, y a menudo, son comórbidos con depresión (DSM-V, 2013, ver tabla 2).

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica, entre los trastornos psiquiátricos que se presentan en México, los trastornos de ansiedad fueron los más comunes (14.3 %, alguna vez en su vida), los cuales tienen un inicio más temprano en la vida (Medina-Mora et al., 2003) y se han asociado a un incremento del riesgo para consumir drogas de abuso (DSM-V, 2013).

Tabla 2. Prevalencia, comorbilidad y distribución por género de los trastornos de ansiedad.

Desorden	Prevalencia de vida (%)	Mujeres: Hombres	Comorbilidad
Desorden de pánico	2%-4%	2+:1	Depresión, otros desórdenes de ansiedad
Ansiedad generalizada	5%-7%	2:1	En conjunto, 90%; 50-60% u otros desórdenes de ansiedad
Fobia social	13%-16%	1+:1	Doble riesgo para dependencia al alcohol, de tres a seis veces de riesgo para desórdenes del humor
Fobia específica	10%	2:1	Depresión y desórdenes somatoformes
Agorafobia	6%	2:1	
Desorden obsesivo compulsivo	2%-3%	1:1	Ansiedad, depresión, tics, hipocondriasis, desórdenes de alimentación.
Desorden de estrés post-traumático	7%-9%	2:1	Depresión, desorden obsesivo-compulsivo, pánico, fobias.

Tomado de Hollander E., Simeon, 2008.

A continuación se describen brevemente los trastornos de interés para la presente investigación.

2.2.4 Desorden de ansiedad generalizada (DAG) y agorafobia

En la siguiente tabla se resume las principales características que diferencian al DAG y agorafobia de otros trastornos de ansiedad.

Tabla 3. Principales criterios diagnósticos para el DAG y agorafobia

DAG	AGORAFOBIA
Ansiedad y preocupación excesiva (expectación aprensiva) debido a un número de eventos con una duración de por lo menos seis meses.	El miedo, ansiedad, o evitación es persistente, típicamente por lo menos por seis meses o más.
La persona encuentra dificultad para controlar la preocupación, lo cual interfiere con la atención de sus tareas	El miedo o ansiedad esta fuera de proporción para el actual peligro y la cantidad de miedo experimentado puede variar con la proximidad a la situación temida
La ansiedad y preocupación están asociadas con tres (o más) de los siguientes seis síntomas: 1) Intranquilidad o sentimiento de excitado, 2) Fatiga fácilmente, 3) Dificultad para concentrarse, 4) Irritabilidad, 5) Tensión muscular y 6) Trastorno del sueño.	Miedo o ansiedad marcada o intensa desencadenada por la exposición real o anticipada debido a dos (o más) de las siguientes cinco situaciones: uso de transporte público, estar en lugares abiertos, estar en lugares cerrados, encontrarse en una multitud, estar solo fuera de casa.
El trastorno no es debido a los efectos de una sustancia (por ejemplo, el abuso de una droga o medicamento) o a otra condición médica general (por ejemplo, hipertiroidismo).	Las situaciones agorafóbicas son activamente evitadas, requiere de la presencia de un acompañante o es soportado con intenso miedo y ansiedad.
El miedo, ansiedad (o evitación, en caso de agorafobia), no es mejor explicado por los síntomas de otros desórdenes mentales.	
El miedo, ansiedad, preocupación (o evitación, en el caso de agorafobia) causa clínicamente un significativo malestar o deterioro en las áreas social, laboral, o en otras importantes áreas del funcionamiento.	

Tomado del DSM-V, 2013.

2.2.5 Etiología de la ansiedad

La etiología de estos trastornos es multifactorial, lo que significa que se origina por cambios en la fisiología y el ambiente, así como por la genética. Estudios sobre la genética de los trastornos de ansiedad sugieren un componente hereditario, el cual difiere considerablemente entre subtipos de desórdenes de ansiedad. Estudios en familiares y en gemelos han revelado resultados mixtos. Familiares de primer grado

de los pacientes ansiosos tienen mayor riesgo (de tres a cinco veces) de desarrollar un trastorno de ansiedad en comparación con los controles (Brüne, 2008).

Los traumas de inicio temprano, tales como el abuso emocional y sexual, la negligencia de los padres y una mayor ansiedad en éstos, son los factores ambientales de riesgo más significativos para padecer trastornos de ansiedad. Además, también constituyen importantes factores de riesgo los accidentes, la violencia doméstica o social, y la exposición crónica a eventos que amenazan la vida. Se ha demostrado que cuando los sujetos tienen estrategias de enfrentamiento insuficientemente desarrolladas, como la baja auto eficacia y una sensación de descontrol, aumenta el riesgo para los desórdenes de ansiedad (Brüne, 2008).

Algunas condiciones fisiológicas como el estado endocrino, la edad y/o diferencias de género inducen o exacerban los cuadros ansiosos. La edad adulta incrementa el riesgo de padecer algunos tipos de ansiedad, de hecho el consumo de benzodiazepinas es alto en esta población (Flint, 1997). En cuanto a diferencias de género, las mujeres son más propensas que los hombres a desarrollar trastornos de ansiedad, lo que sugiere que los factores ligados al sexo, como los esteroides gonadales, pueden influir en su etiología y/o expresión. De este modo, los bajos niveles de estradiol durante el periodo pre-menstrual y el postparto conducen a un mayor riesgo de padecer este tipo de trastornos, así como en la etapa de la perimenopausia, donde el nivel de esta hormona también es muy bajo. (Walf y Frye, 2005). En los hombres, el cambio hormonal más importante relacionado al envejecimiento es la reducción gradual de testosterona. Este efecto está relacionado a desórdenes neurobiológicos como ansiedad, estrés, insomnio y depresión (Zhao et al., 2008).

2.2.6 Tratamientos farmacológicos para los trastornos de ansiedad

La primera línea de tratamiento para diversos desórdenes de ansiedad son los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) (ver tabla 5); sin embargo, estos fármacos tienen efectos adversos potencialmente problemáticos (Möhler, 2012). Aunque los antidepresivos tricíclicos han sido utilizados con éxito en algunos desórdenes de ansiedad, están asociados con una mayor carga de efectos adversos que los ISRS y son utilizados generalmente después de una pobre o nula respuesta al tratamiento de los ISRS (Möhler, 2012). Las benzodiazepinas son la clase más antigua de medicamentos utilizados para tratar la ansiedad. A pesar de que tienen la ventaja de un rápido inicio de acción, tienen efectos secundarios, como tolerancia y dependencia, los cuales han limitado su uso. Además, hay posibles síndromes de abstinencia que resultan en ansiedad, incluso reacciones tan graves como el *delirium tremens*. Estos medicamentos son ideales para los pacientes que experimentan episodios poco frecuentes de ansiedad o episodios de insomnio relacionado con la ansiedad (Cassano et al., 2002). Por otro lado, se ha reportado que la buspirona (agonista del receptor 5HT1A) es un fármaco no benzodiazepínico indicado para el DAG, tiene un inicio de acción más lento y carece de propiedades sedantes, por lo que es menos útil para el paciente ansioso que necesita un sedante. La buspirona no altera el estado de alerta y carece de un potencial de abuso (Cassano et al., 2002). El propranolol tienen acción preferentemente periférica en la ansiedad, se utiliza sobre todo para prevenir ansiedad anticipatoria cuando se presupone que pueden aparecer síntomas como temblor, taquicardia, etc., y cuando se quiere asegurar que no afecte el nivel de alerta (Lobo, 2013). En la siguiente tabla

se resume los efectos secundarios y los desórdenes de ansiedad en los que actúan los fármacos mencionados anteriormente.

Tabla 5. Principales medicamentos usados en los desórdenes de ansiedad

Fármaco/ejemplos	Efectos secundarios	Desórdenes en el que actúa
<ul style="list-style-type: none"> Benzodiacepinas 		
Alprazolam, clonazepam Loazepam	Somnolencia, fatiga, sedación, mareo, depresión.	DAG, DP/AG, DEPT DAS.
<ul style="list-style-type: none"> Antidepresivos triciclicos 		
Clomipramina, imipramina	Aumento de peso, sedación, boca seca.	DOC, DP/AG, DEPT, DAG
<ul style="list-style-type: none"> ISRS 		
Paroxetina, sertralina	Nauseas, insomnio, falla en la eyaculación.	DOC, DP/AG, DAS, DEPT, DAG
<ul style="list-style-type: none"> Nuevos Antidepresivos 		
Venlafaxin	Nauseas, boca seca, insomnio, mareo.	DAG, DP/AG
<ul style="list-style-type: none"> Otros 		
Buspirona Propanolol	Mareo, nauseas Sedación, depresión	DAG DAG

Tomado de Cassano et al., 2002. DAG, desorden de ansiedad generalizada; DP/AG, desorden de pánico/agorafobia; DEPT, desorden de estrés post-traumático; DAS, desorden de ansiedad social; DOC, desorden obsesivo compulsivo

2.3 Sistema GABAérgico

2.3.1 GABA en el SNC

En la expresión y cronicidad de la ansiedad participan varios sistemas de neurotransmisión, como los monoaminérgicos y el sistema del ácido gama-aminobutírico (GABA).

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante del Sistema Nervioso Central, pues 30-40% de las neuronas del cerebro lo utilizan. En mamíferos es encontrado en altas concentraciones en el cerebro y en la médula espinal pero está ausente o presente solamente en cantidades traza en el tejido nervioso periférico o en tejidos periféricos. El cerebro también contiene grandes cantidades de ácido glutámico, el cual es el principal precursor de GABA. GABA es formado por la α -descarboxilación del ácido α -glutámico, una reacción catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) que se encuentra solamente en el SNC de mamíferos y en el tejido de la retina.

GABA controla los estados de excitabilidad en todas las áreas del cerebro, por lo que su existencia en el tejido nervioso garantiza el equilibrio entre excitación (actividad principalmente glutamatérgica) e inhibición neuronal (actividad GABAérgica), un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora. Si el balance es a favor de GABA, entonces aparece sedación, amnesia y ataxia. Por otro lado, la más leve atenuación del sistema GABAérgico resulta en excitación, ansiedad, intranquilidad, insomnio y reactividad exagerada (Nutt, 2001). Por lo que es válido pensar que las alteraciones en la función GABAérgica son el sustrato

fisiológico para el desarrollo de diversos trastornos de ansiedad (Cortes-Romero et al., 2011).

La llegada de un potencial de acción u otros estímulos despolarizantes en la terminal presináptica GABAérgica inicia una secuencia de eventos que en última instancia resulta en la fusión vesicular y liberación de GABA dentro de la hendedura sináptica. Después de la liberación, la acción de GABA es terminada en gran parte siendo removida (eliminada) de la hendedura sináptica por la acción de varios tipos de transportadores de membrana plasmática ubicados en las neuronas y en la glía. Cuando las moléculas de GABA son captadas por un astrocito adyacente se convierten a glutamato por mediación de la GABA transaminasa (Cooper et al., 2003).

2.3.2 Receptores a GABA

Las sinapsis inhibitorias que utilizan GABA como su transmisor utilizan dos tipos de receptores llamados GABA_A, y GABA_B (Sigel et al., 2012). Los receptores GABA_A son canales iónicos activados por ligandos (ionotrópicos), mientras que los receptores GABA_B son receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos). Los receptores GABA_A son usualmente inhibitorios debido a que sus canales asociados son permeables a Cl⁻; el flujo de estos iones hacia el interior celular inhiben a las neuronas post-sinápticas (Purves, 2001).

Los receptores metabotrópicos (GABA_B) están ampliamente distribuidos en el cerebro y también se encuentran en los plexos nerviosos autónomos periféricos. Los receptores GABA_B también son inhibitorios, aunque la inhibición es mediada por un mecanismo diferente: la activación de canales K⁺, la cual induce una corriente

inhibitoria post-sináptica; un segundo mecanismo es el bloqueo canales Ca^{2+} , el cual tiende a hiperpolarizar las células post-sinápticas (Purves, 2001).

2.3.3 Receptor GABA_A

El receptor GABA_A es miembro de una super familia de canales iónicos activados por ligando. Los receptores GABA_A (de naturaleza glicoproteica) están constituidos por una combinación de cinco tipos de subunidades que al ensamblarse forman un poro o canal específico para Cl^- o HCO_3^- . Se conocen por lo menos 19 subunidades distintas para estos receptores: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, $\rho 1-3$, δ , ϵ , π y θ , siendo la subunidad β el sitio de reconocimiento para el agonista. Como resultado de esta gran variabilidad de subunidades, la función de los receptores GABA_A difiere ampliamente entre los tipos neuronales (Purves, 2001).

Existe la propuesta de que hay por lo menos 11 sitios estructuralmente distintos presentes en los receptores GABA_A : para agonistas y antagonistas competitivos, para picrotoxina y pesticidas, para barbitúricos sedativos e hipnóticos, para esteroides neuroactivos, para benzodiazepinas, de reconocimiento para anestésico inhalados, para furosemda, para iones Zn^{2+} , para otros iones divalentes y para La^{3+} (Cortes-Romero et al., 2011).

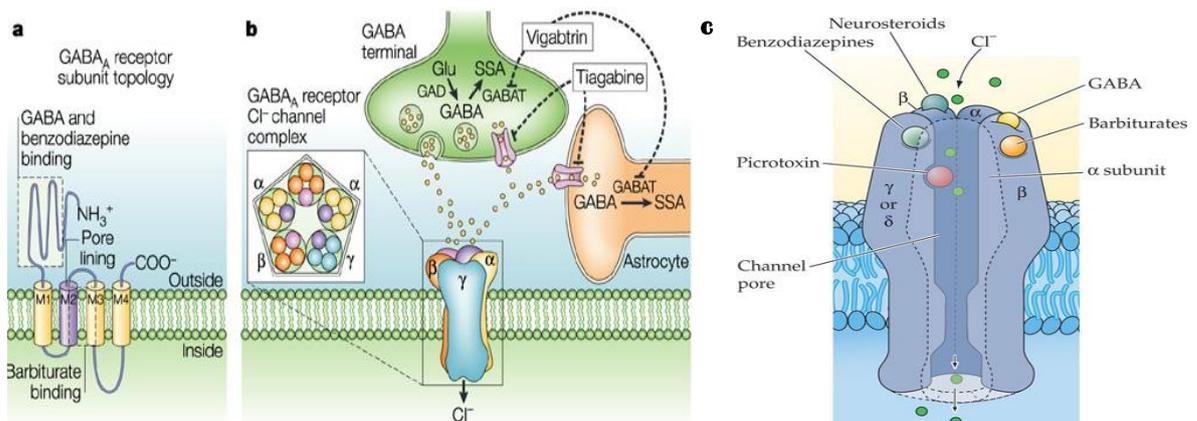


Figura 3. Figura que muestra a) la estructura (la topología) de una subunidad del receptor GABA_A y b) la síntesis del neurotransmisor GABA en una terminal presináptica a partir de glutamato a través de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Cuando GABA se libera de la terminal presináptica es captado por los transportadores de captación (cilindros) de neuronas y astrocitos y posteriormente es degradado por la enzima GABA transaminasa (GABAT) a succinato semialdehído (SSA); vigabatrin es un inhibidor irreversible de GABAT. Los transportadores de captación son inhibidos por tiagabina. La estructura pentamérica de los receptores GABA_A está representada a la izquierda. La figura c muestra los diferentes sitios de unión de picrotoxina, GABA y benzodiazepinas al receptor GABA_A. Figura a y b tomada de Rogawski y Löscher, 2004. Figura c tomada de Meyer, 2013.

2.3.4 GABA en ansiedad

A través de estudios farmacológicos y genéticos tanto en la clínica como en animales de laboratorio se ha demostrado que alteraciones del sistema GABAérgico están vinculadas a la patofisiología de los desórdenes de ansiedad.

Por un lado, el aumento de la transmisión GABérgica inducida por fármacos disminuye la ansiedad (efecto ansiolítico), mientras que una reducción de la transmisión de GABA por la administración de un agonista inverso del sitio de benzodiazepinas causa ansiedad (efecto ansiogénico). Estos efectos, ansiolítico y ansiogénico, se deben a la modulación de la actividad de los receptores GABA_A (Rodríguez-Landa, et al., 2013).

Ha sido ampliamente aceptado que pacientes con diversos desordenes de ansiedad (de pánico, de estrés post-traumático y de ansiedad generalizada) tienen una reducción de la unión de benzodiazepinas al receptor GABA_A en varias regiones cerebrales, en comparación con sujetos sanos (Lydiard, 2003). Se ha demostrado en pacientes con desorden de pánico una reducción de la unión de flumanezil (una

benzodiazepina) al receptor GABA-benzodiazepinas ($GABA_A$) a través de todo el cerebro en comparación con sujetos control. La mayor disminución se observó en áreas como la corteza orbitofrontal y la ínsula (Sandford et al., 2000). También se ha reportado una reducción de la unión de las benzodiazepinas al receptor en el lóbulo temporal en el desorden de ansiedad generalizada. También, cabe destacar que veteranos de combate con desorden de estrés postraumático tienen un déficit del receptor $GABA_A$ en la corteza prefrontal (Möhler, 2012). Esta evidencia sugiere que los pacientes con trastornos de ansiedad tienen una reducción en los niveles o función de los receptores $GABA_A$.

Estudios realizados en ratones apoyan esta idea ya que han demostrado que una reducción parcial de la función del receptor $GABA_A$ durante el desarrollo induce, en la edad adulta, una mayor vulnerabilidad a las conductas tipo ansiedad. Así, una inactivación del gen de la subunidad γ_2 resultó en un déficit parcial de los receptores $GABA_A$ principalmente en el hipocampo y en la corteza cerebral. Estos animales asumieron un comportamiento que recuerda al desorden de ansiedad generalizada en los seres humanos. Notablemente y en paralelo con la respuesta de los humanos a fármacos, la conducta de ansiedad en estos ratones fue suprimida no sólo con diazepam sino también con fluoxetina y desipramina administradas crónicamente (Möhler, 2012), esto además revela que existe una relación entre el sistema GABAérgico y los sistemas de monoaminas.

2.4 Otros neurotransmisores relacionados con la ansiedad

2.4.1 Noradrenalina y Serotonina

La noradrenalina es una catecolamina que incrementa en situaciones de alerta. El tema central de la teoría noradrenérgica de ansiedad es que un aumento de la

liberación noradrenérgica conduce a ansiedad. La evidencia que apoya esta teoría incluye: a) los efectos ansiogénicos de fármacos que incrementan la disponibilidad de noradrenalina en varias regiones cerebrales (hipotálamo, la amígdala y el locus coeruleus) se ha demostrado en diversos estudios en ratas (Sandford et al., 2000; Steimer, 2002), 2) el *locus coeruleus* tiene un papel central en el control de la excitación y ansiedad, pues a través de la estimulación directa de esta área se producen respuestas de miedo en animales, mientras que la destrucción de esta área bloquea la respuesta 3) evidencia de un incremento de la actividad simpática se correlaciona con niveles de ansiedad en paradigmas de exposición y 4) los fármacos que regulan la actividad noradrenérgica a nivel central producen efectos ansiolíticos y/o ansiogénicos (Sandford et al., 2000).

La serotonina también ha sido implicada en la neuroquímica de la ansiedad, pues ya está bien establecido que fármacos que inhiben selectivamente la recaptura de serotonina, como la fluoxetina y el escitalopram, son clínicamente eficaces para el control de la ansiedad (Brüne, 2008). El tratamiento crónico con estos compuestos permite un mejor funcionamiento de las neuronas serotoninérgicas cuyos somas se encuentran concentrados en los núcleos del rafe. Estos ISRS mejoran la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas así como el mecanismo de autorregulación de dichas neuronas. Los núcleos del rafe son importantes en la ansiedad, ya que el rafe dorsal envía fibras a la sustancia gris periacueductal (vía que participa en la respuesta de pánico) así como a la amígdala y a la corteza frontal (vía que participa en la ansiedad anticipatoria y miedo condicionado) (Sandford et al., 2000).

2.5 Neurobiología de la ansiedad

La ansiedad innata o condicionada involucra la participación de varias regiones cerebrales capaces de modular la expresión conductual y las reacciones vegetativas asociadas al miedo. Esta red es compleja por lo que se explicarán las funciones de las estructuras más relevantes como: la amígdala central y basolateral, el núcleo de la cama de la estria terminal, el hipocampo, el hipotálamo, el septum, la sustancia gris periacueductal y el *locus coeruleus*.

La amígdala es una estructura formada por varios núcleos, tiene interconexiones con la corteza, el hipocampo, el núcleo de la cama de la estria terminal, el *locus coeruleus*, el hipotálamo y el tallo cerebral. Esto significa que ejerce control sobre respuestas locomotoras, neuroendocrinas, autonómicas y respiratorias. Estudios experimentales implican a la amígdala en la expresión, condicionamiento y extinción del miedo o ansiedad aguda. La lesión de la parte anterior y posterior de la amígdala central (AmC) y la parte anterior de la amígdala basolateral (BLA) de la rata reduce la ansiedad; a su vez, la estimulación de la AmC aumenta la formación de úlceras gástricas evocadas por inmovilización (Yadin et al., 1993). También se ha demostrado, que la aplicación *in situ* de benzodiazepinas y del barbitúrico fenobarbital en la amígdala, produce acciones ansiolíticas, las cuales son antagonizadas por el flumazenil, un antagonista del complejo receptor GABA-benzodiazepina. Las conexiones entre la BLA y la corteza prefrontal permite la identificación del estímulo adverso, mientras que las conexiones con el hipocampo participan en el miedo condicionado y en el reconocimiento de un medio ambiente peligroso. Las proyecciones de la amígdala a la sustancia gris periacueductal (SGP), al tronco cerebral y al hipotálamo median la respuesta fisiológica (Adhikari, 2014).

El núcleo de la cama de la estría terminal se considera actualmente una extensión de la amígdala, esta estructura recibe conexiones de la AmC y a su vez, envía proyecciones al tallo cerebral y al hipotálamo. Mediante este circuito se modula tanto la expresión de la ansiedad como las respuestas fisiológicas asociadas (Adhikari, 2014).

El hipocampo está implicado en la discriminación de estímulos adversos tanto conocidos como nuevos, requiriendo una respuesta automática condicionada o un procesamiento mayor, respectivamente. El hipocampo desempeña esta función junto con otras estructuras como el septum, el cíngulo posterior, y los núcleos talámicos. Junto con la amígdala participa en el aprendizaje de estímulos adversos, y la sincronía en su actividad eléctrica está correlacionada con las conductas de temor en los modelos de ansiedad innata (Adhikari, 2014).

El hipotálamo recibe entradas del sistema límbico, la amígdala y el *locus coeruleus*, y por ello tiene un papel clave en la coordinación de la respuesta neuroendocrina en la ansiedad, es decir la activación del sistema Hipotálamo–Hipófisis–Adrenal (HHA)/simpatoadrenal, mediante la liberación de péptidos y hormonas.

El septum tiene un papel central en la génesis de las emociones, especialmente en la ansiedad. Algunos experimentos han evidenciado que la estimulación eléctrica del área septal lateral produce ansiólisis, mientras que la lesión de esta zona incrementa la ansiedad, incluso, la estimulación del septum lateral dorsal mitiga la formación de úlceras gástricas inducidas por inmovilización (Yadin et al., 1993).

Los núcleos del tallo cerebral son responsables de las correlaciones fisiológicas de ansiedad, miedo y pánico. La sustancia gris periacueductual (SGP) recibe aferencias de la corteza paralímbica y del sistema límbico, así como

aferencias de estructuras sensoriales. La estimulación de la SGP ventrolateral provoca *freezing*, hipotensión, bradicardia, y analgesia. La estimulación de la SGP lateral produce respuestas de “escape-huida” acompañadas con taquicardia y flujo sanguíneo aumentado (Sandford et al., 2000).

El *locus coeruleus* es un núcleo noradrenérgico con eferencias a la corteza, áreas límbicas, y tálamo. Su estimulación por métodos electrofisiológicos y farmacológicos causa respuestas de ansiedad y pánico; estas conductas pueden ser bloqueadas por lesiones del *locus coeruleus*, así como por fármacos anti-adrenérgicos y ansiolíticos (Sandford et al., 2000).

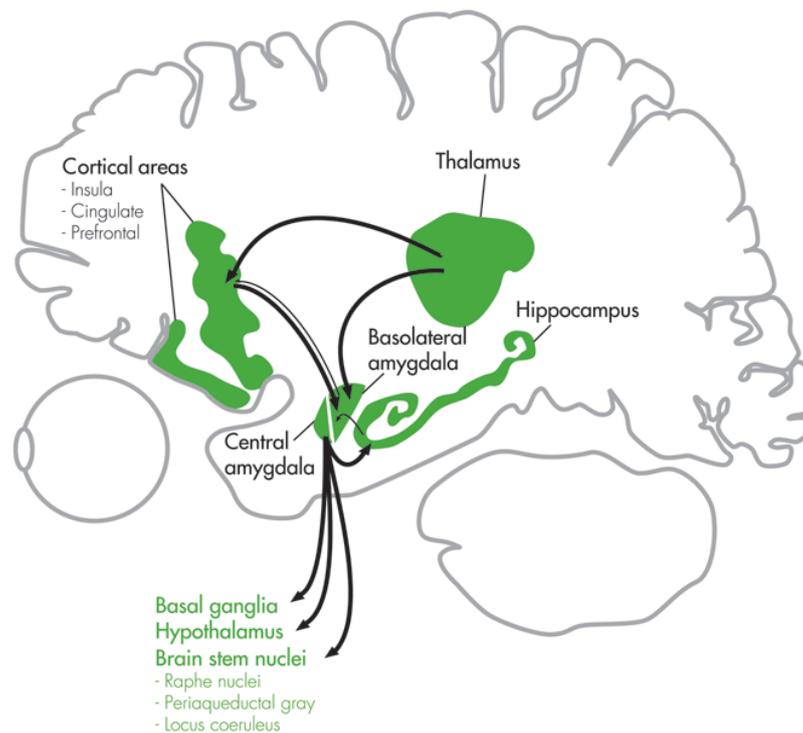


Figura 4. Circuitos cerebrales implicados en miedo y ansiedad. Tomado de The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology

2.6 Modelos animales de ansiedad

Los modelos animales de ansiedad intentan representar algunos aspectos de la etiología, sintomatología, o tratamiento del desorden de ansiedad, para facilitar su estudio científico (Treit et al., 2010). El uso de modelos animales de ansiedad ha permitido el notable desarrollo de fármacos, pero también el estudio de la conducta ansiosa normal y sus alteraciones, así como sus posibles bases neurobiológicas; los hallazgos obtenidos a partir de estos modelos animales pueden ser considerados al momento de analizar el trastorno clínico. De esta forma, se considera un buen modelo animal de ansiedad aquél que además de permitir el desarrollo de fármacos, refleje aspectos comunes (neuroanatómicos, neuroquímicos y conductuales) del fenómeno en los animales y en los seres humanos (Gómez et al., 2002).

Para que un modelo animal de ansiedad sea válido, es necesario que cumpla con los siguientes tipos de validez:

Validez de apariencia: se refiere a la aparente similitud entre la conducta observada en el modelo y los síntomas específicos del desorden de ansiedad (Koob et al., 1998).

Validez predictiva: Se refiere a la sensibilidad selectiva de los modelos a los efectos de fármacos ansiolíticos bien establecidas, además de su capacidad de discriminar entre compuestos ansiolíticos de los que no lo son (Treit et al., 2010).

Validez de constructo: Considera que las hipótesis que explican el trastorno en el humano también lo deben hacer en el modelo.

Validez convergente: Es el grado en el cual el modelo se relaciona con otros modelos de ansiedad (Koob et al., 1998).

Validez etiológica: La etiología debe ser idéntica entre el modelo animal y la condición humana (Koob et al., 1998).

2.6.1 Modelos condicionados y modelos no condicionados

En el estudio de la ansiedad, se han desarrollado cerca de 30 modelos animales que permiten observar y cuantificar conductas de diversa índole. Entre estos, se encuentran los modelos condicionados y los modelos no condicionados. **Los modelos condicionados**, también llamados modelos de conflicto, se basan en conductas condicionadas, es decir, en procedimientos de castigo que consisten en aplicar un estímulo adverso (choques eléctricos, privación de comida y agua, etc.) a un animal entrenado para emitir una respuesta determinada. Entre este tipo de modelos se encuentran las pruebas de conflicto de Vogel y Geller-Seifter, donde el animal es perturbado por dos impulsos antagónicos, uno es la realización de una conducta como comer o beber, y otro la posibilidad de recibir, durante la consumación de dicha conducta, un estímulo adverso reconocido como tal mediante el aprendizaje. Estos modelos facilitan el control de la expresión de la conducta, sin embargo, los animales son expuestos a estímulos no habituales en su entorno natural por lo que necesitan un entrenamiento previo. De esta forma, reflejan mecanismos complejos relacionados al aprendizaje que se asume, deben tener bases neurales complejas. Los modelos condicionados contrastan con los **modelos no condicionados** en los que intervienen conductas derivadas directamente de la presión evolutiva, las cuales posiblemente tienen bases neurales menos complejas y más relacionadas con el sustrato neuronal de la ansiedad (Gómez et al., 2002).

Los modelos no condicionados se han desarrollado a partir de la identificación del repertorio conductual natural de los roedores. La expresión de conductas de

temor (interpretadas como ansiedad) en roedores se relaciona con sus miedos naturales a lugares novedosos, espacios abiertos o bien iluminados, olores de depredadores, estímulos nocivos o que generan molestia. Existen pruebas que modifican la relación entre conespecíficos, pruebas sociales como la de vocalizaciones ultrasónicas inducidas por la separación de individuos con una relación filial y las pruebas de conductas defensivas, que son desplegadas ante estímulos perturbadores (Gómez et al., 2002). Aunque se ha considerado que estos modelos presentan más variabilidad en los valores conductuales basales, se les atribuye un nivel más alto de validez neurobiológica (Rodgers et al., 1997) ya que no requieren entrenamiento y no implican procesos complejos tales como el aprendizaje-memoria, hambre-sed o mecanismos nociceptivos (Rodgers et al., 1997). Dadas las características de los modelos no condicionados, en este trabajo se usaron dos: la prueba de laberinto elevado en cruz y la prueba de enterramiento defensivo.

2.6.2 Prueba de enterramiento defensivo

En 1978 Treit, Pinel y Fibiger introdujeron el paradigma de enterramiento defensivo como un modelo animal para el estudio de agentes ansiolíticos y sus mecanismos de acción. La conducta de enterramiento defensivo, junto con las conductas de huida, *freezing* y lucha, constituye el repertorio conductual de reacciones defensivas incondicionadas que son desplegadas innatamente por el animal (De Boer et al., 2003), que son dependientes tanto de la amenaza inminente (Ratner, 1967) como por la oportunidad de escape (Blanchard et al., 1990; Rodgers, 1997). La conducta de enterramiento está basada en la tendencia innata de los roedores a enterrar un objeto o estímulo nocivo o amenazante (Treit et al., 1981). Consiste en un patrón

conductual dirigido a ocultar este estímulo mediante el desplazamiento del material de cama (aserrín, *pellets* de olote, etc.) con movimientos alternantes de sus patas delanteras y con movimientos de su cabeza dirigidos hacia el estímulo adverso. Se ha señalado que mediante este repertorio conductual los roedores pueden exitosamente evitar o eliminar el estímulo adverso y posiblemente los peligros de su hábitat que amenazan su vida (De Boer et al., 2003). La conducta defensiva de enterramiento parece tener su paralelo evolutivo en la conducta de bloqueo de túneles, desplegada por los animales excavadores (Lister, 1990).

El grado con el que el roedor presenta la conducta defensiva de enterramiento depende de dos tipos de variables:

- a) de procedimiento, como son el tipo e intensidad del estímulo aversivo, tipo y disponibilidad de material, tamaño, forma y familiaridad de la caja de prueba y los niveles de iluminación.
- b) orgánicas, como son el tipo de especie, cepa, edad, sexo, estado fisiológico y experiencias previas a la prueba (De Boer et al., 2003).

Por otro lado, la conducta de *freezing* en respuesta a un estímulo adverso es también una medida de ansiedad en roedores; esta conducta se refiere al tiempo en que la rata, después de recibir el choque, permanece inmóvil y con la mirada fija al estímulo adverso; se acompaña de piloerección y taquicardia y se interpreta como una expresión de pánico (Rogel-Salazar et al., 2011).

En términos de validez de apariencia, el desorden de ansiedad modelado a través de la prueba de enterramiento defensivo puede ser equivalente a la fobia específica, cuya principal característica es un marcado y persistente miedo circunscrito a objetos o a situaciones (Koob et al., 1998). Sin embargo, la prueba de enterramiento defensivo también se ha reportado ampliamente como equivalente a

ansiedad generalizada (Treit, 1985), pues responde de forma específica a los ansiolíticos usados para tratar este desorden (ver tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos para el desorden de ansiedad generalizada y fobia específica, así como para la prueba de enterramiento defensivo

Fármaco	Ansiedad generalizada	Fobia Específica	Enterramiento Defensivo
Benzodiacepinas	Oxacepam, clorazepan, alprazolam, lorazepam ¹² , diacepam ^{1, 11, 12} , clordiacepoxido ^{1, 12}		Clordiacepóxido ^{1, 4} , diazepam ^{1, 3, 9}
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina	Paroxetina, sertralina ⁸ , escitalopram, fluvoxamina ¹²	Paroxetina y escitalopram ¹¹	Fluoxetina ¹⁰
Inhibidor de la recaptura de serotonina y noradrenalina	Venlafaxina ^{8, 12} , Duloxetina ¹¹		
Agonistas selectivos de los receptores 5-HT1A	Azapironas (buspirona) ^{8, 11, 12}		Buspirona ^{1, 6, 9} , ipsapirona y 8-OHDPAT ^{3, 6}
Antidepresivos tricíclicos	Imipramina ^{8, 11} , trazodona, Desipramina ¹¹		Desipramina ⁷ , imipramina ² , midazolam ⁵
Antidepresivos serotoninérgicos y noradrenérgicos específicos	Mirtazapina, bupropion ¹¹		

Tabla 6. Referencias: 1) Treit et al., 1981, 2) Craft et al., 1988, 3) Fernández-Guasti et al., 1989, 4) De Boer et al., 1990, 5) Treit et al., 1990, 6) López-Rubalcava., 1996, 7) Fernández-Guasti et al., 1999, 8) Nutt et al., 2002, 9) De Boer et al., 2003, 10) Degroot, 2005, 11) Davidson et al., 2009, 12) Podea y Ratoiu, 2011.

Estudios farmacológicos confirman la validez predictiva de la prueba, ya que ansiolíticos como las benzodiazepinas y los agonistas selectivos de los receptores 5-HT1A, suprimen la conducta de enterramiento de una forma relacionada con la dosis, mientras que algunos agentes ansiogénicos aumentan el tiempo de enterramiento (De Boer, et al., 2003). Estudios adicionales corroboraron una correlación endócrina con la respuesta conductual, pues las ratas que recibieron choques eléctricos mostraron un incremento de la concentración de corticosterona y adrenalina en plasma; estas respuestas fueron contrarrestadas con ansiolíticos (Treit et al., 1993).

2.6.3 Prueba de laberinto elevado en cruz

La prueba de laberinto elevado en cruz es una modificación hecha por Handley y Mithani en 1984 a un procedimiento de Montgomery. Este último autor utilizó un laberinto en forma de Y, que consistió en una caja con dos salidas en forma de brazo, uno abierto y otro cerrado y los animales expuestos al laberinto, presentaron dos conductas, exploración y ansiedad, generando así, una conducta de conflicto de aproximación-evitación. Los animales claramente preferían el brazo cerrado del laberinto mientras que el brazo abierto evocaba una mayor ansiedad, y por lo tanto, una mayor conducta de evitación (Pellow et al., 1985).

La prueba de laberinto elevado en cruz incluye el estudio de patrones de actividad exploratoria espontánea en individuos expuestos a ambientes desconocidos (Gómez et al., 2002). Esta prueba consiste en la libre exploración de la rata durante un periodo de diez minutos (o cinco), a un laberinto elevado a una altura de 50 cm en el que se encuentran dos distintos ambientes interceptados en

forma de cruz: uno expuesto, que consiste de dos brazos abiertos; y otro no expuesto, que consiste de dos brazos cerrados que cuentan con paredes.

Los procesos de ansiedad innatos motivan a los animales a preferir el área no expuesta del laberinto, es decir, los brazos cerrados (Koob et al., 1998). La exposición a los brazos abiertos, incrementa conductas relacionadas a ansiedad (*freezing*, inmovilidad, defecación) y la concentración de corticosterona en plasma (Pellow et al., 1985).

Esta prueba presenta validez de apariencia, pues en humanos ansiosos también pueden exhibir miedo a las alturas y a los espacios abiertos, e incluso pueden exhibir tigmotaxis y evaluación del riesgo bajo estas condiciones, sugiriendo algún grado de isomorfismo u homología (Treit, 2010). La prueba de laberinto elevado en cruz presenta una importante validez predictiva en respuesta a los tratamientos, pues ha mostrado una gran sensibilidad a fármacos ansiolíticos establecidos clínicamente, los cuales incrementan de forma selectiva la exploración de los brazos abiertos. Similarmente, una disminución en la exploración de los brazos abiertos fue observada con compuestos ansiogénicos (Pellow et al., 1985).

2.7 Modelos animales en la fitofarmacología

Los modelos de enterramiento defensivo y laberinto elevado son ampliamente utilizados en el cernimiento farmacológico de extractos de plantas usadas en la medicina tradicional de muchos países. Usualmente el efecto de extractos de plantas o fitofármacos se compara con el efecto de fármacos de referencia como las benzodiazepinas o los ISRS. Estos modelos también se usan en la investigación de los mecanismos de acción subyacentes a los efectos ansiolíticos inducidos por los

extractos o fitofármacos, lo que les confiere mayor validez en la investigación de la medicina alternativa (Rejón-Orantes, 2011).

3. Planteamiento del problema

La damiana de California (*Turnera diffusa* Willd. ex Schult.) es una planta que tiene un uso amplio en la medicina tradicional mexicana, sin embargo, son pocos los estudios que demuestran sus propiedades farmacológicas. En un reporte previo se mostró que un extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., de composición conocida, produjo efectos ansiolíticos a través de la reducción de la conducta defensiva de enterramiento (Estrada-Reyes et al., 2013); sin embargo, se desconoce si dichos efectos se establecen sobre otras expresiones de ansiedad en la rata. Por tal motivo es de gran importancia realizar un estudio descriptivo del efecto ansiolítico de un extracto acuoso de esta especie, utilizando un rango de dosis más amplio y dos modelos animales de ansiedad no condicionada. Además, es importante elucidar un mecanismo de acción para los efectos ansiolíticos de esta planta.

4. Hipótesis

El extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. producirá un efecto ansiolítico en dos modelos de ansiedad no condicionada, el laberinto elevado y la prueba de enterramiento defensivo, y en dicho efecto participarán los receptores GABA_A.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si un extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. produce efectos ansiolíticos en ratas macho Wistar, en dos modelos animales de ansiedad, y elucidar su mecanismo de acción.

5.2 Objetivos particulares

Determinar si el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en ratas Wistar macho tiene propiedades ansiolíticas en la prueba de enterramiento defensivo.

Determinar si el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en ratas Wistar macho tiene propiedades ansiolíticas en el laberinto elevado en cruz.

Analizar si el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. produce modificaciones de la actividad motriz de ratas Wistar macho que pudieran interferir con la determinación del efecto ansiolítico.

Analizar la participación de los receptores GABA_A en el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en ambos modelos de ansiedad.

6. Material y métodos

6.1 Sujetos experimentales

Se utilizaron 283 ratas macho adultas (90 PN), de la cepa Wistar, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM). Las ratas fueron alojadas en grupos de cinco en cajas de acrílico transparente (43 x 53 x 20), en cuartos con un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 x 12 horas (la luz se encendió a las 21:00 hrs) y en condiciones controladas de temperatura y humedad. Todas las ratas tuvieron acceso libre a agua y comida. El uso de animales se llevó a cabo bajo los lineamientos de la norma oficial de manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999) y de la norma internacional para el uso de sujetos de experimentación (NIH publicación 85-23, 1985). El presente proyecto fue aprobado tanto por el Comité de Ética en Investigación como por el Comité de Investigación del INPRFM (3370.3).

6.2 Preparación del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

Las hojas de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. fueron colectadas en el estado de Hidalgo, México y fueron autenticadas por la botánica Abigail Aguilar, un ejemplar fue depositado en el herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (Vaucher No. IMSSM- 11486).

El extracto liofilizado de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. fue proporcionado por la Dra. Rosa Estrada Reyes, del laboratorio de Fitofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría. A continuación se describe brevemente el método de extracción. Las hojas fueron secadas al aire y finamente molidas. El extracto acuoso fue preparado

a una proporción de 10 gramos de material vegetal por 90 ml de agua destilada hirviendo, calentada por 10 minutos y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. El extracto fue liofilizado en un liofilizador Telstar a -50 °C y 0.01 mbar. Cada 10 gramos de planta seca produjo 2 gramos de polvo liofilizado (rendimiento del 20 %). Las dosis fueron expresadas como peso de polvo liofilizado/volumen.

Previo a las pruebas, el extracto acuoso liofilizado fue disuelto en solución salina isotónica (0.9 %) y se le agregó una gota de Tween 80 (Sigma Aldrich, San Luis Mo) como humectante. La solución fue agitada en un baño ultrasónico digital (Elma, Transsonic Digital S) por 30-40 minutos a temperatura ambiente.

6.3 Fármacos

Se utilizó picrotoxina (Sigma Aldrich, San Luis Mo), un antagonista de los receptores GABA_A. El fármaco fue disuelto en agua destilada en un agitador magnético (VWR) por 20 minutos a temperatura ambiente.

El efecto ansiolítico del extracto de *T. diffusa* Willd. ex Schult. se comparó con el de un agonista del receptor GABA_A, diazepam (Roche), el cual fue usado como ansiolítico de referencia. El fármaco fue disuelto en solución salina al 0.9 % más 3% de propilenglicol.

6.4 Diseño experimental

6.4.1 Experimento 1

Para determinar el efecto ansiolítico de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. se realizó una curva dosis respuesta en las prueba de laberinto elevado en cruz y enterramiento defensivo. Los animales fueron asignados a grupos independientes

por dosis y por modelo animal. Para la evaluación en la prueba de enterramiento defensivo el tratamiento se administró a las dosis de 0, 5, 10, 20 y 40 mg/kg, mientras que para la evaluación en el laberinto elevado en cruz, además de las dosis señaladas, se evaluó el efecto de 80 mg/kg. La dosis 0 mg/kg del extracto corresponde a la administración del vehículo en el que fue disuelto (solución salina). De acuerdo al estudio de Estrada Reyes et al., 2013, todas las dosis se administraron a un volumen de 2 ml/kg de rata (vía oral) una hora antes de cada prueba. En ambas pruebas, se incluyó un grupo de referencia tratado con diazepam, a una dosis de 2 mg/kg (vía intraperitoneal) media hora antes de la evaluación; este esquema de administración del diazepam ha mostrado tener efecto ansiolítico en ratas (Treit et al., 1981; Treit et al., 1993; Contreras et al., 2011; Carro-Juárez et al., 2012). Inmediatamente después de la prueba de enterramiento las ratas fueron evaluadas en un campo abierto para determinar cambios en la actividad locomotriz. (Estrada-Reyes et al., 2013; Olvera-Hernández y Fernández-Guasti, 2011). En la figura 5 se resume el diseño del experimento 1.

6.4.2 Experimento 2

Este experimento se realizó para comprobar que la dosis de picrotoxina que antagoniza al receptor GABA_A no induce efectos sobre la conducta *per se* (por ejemplo, convulsiones). Se evaluaron cuatro grupos independientes de ratas que fueron administradas con una dosis de antagonista (0, 0.5, 1 o 1.5 mg/kg, vía intraperitoneal) 90 min antes de las pruebas y 30 min antes de la administración oral de solución salina, que fue el vehículo utilizado para disolver el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. Las dosis, así como el tiempo de administración de picrotoxina previo a las pruebas se eligieron con base a estudios previos (Treit et al.,

1982, Carro-Juárez et al., 2012). Posteriormente las ratas fueron evaluadas en cada uno de los modelos de ansiedad. La dosis 0 mg/kg de picrotoxina corresponde a la administración del vehículo en el que se disolvió el antagonista (agua destilada). En la figura 6 se resume este experimento.

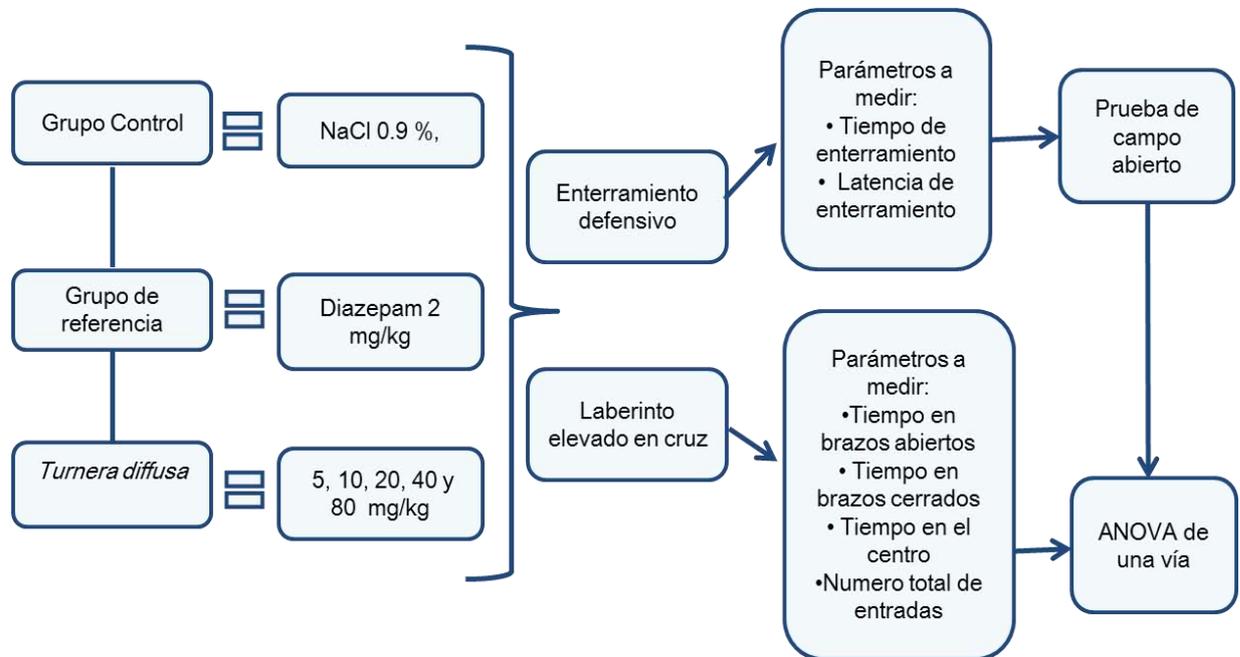


Figura 5. Diagrama que resume el experimento 1

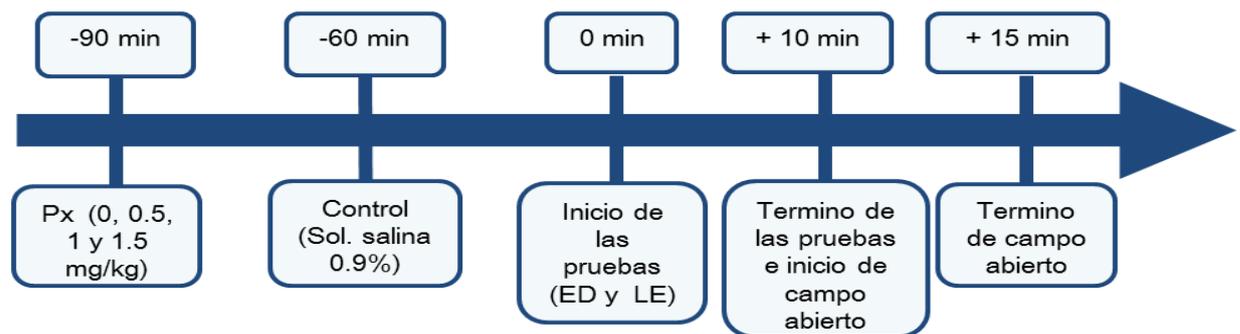


Figura 6. Diagrama que resume el experimento 2.

6.4.3 Experimento 3

En este experimento se analizó la participación de los receptores GABA_A en el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., en ambos modelos animales. Las ratas recibieron tratamientos combinados de acuerdo a la figura 7. La selección de dosis del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. (10 y 40 mg/kg) y picrotoxina (1 y 1.5 mg/kg) se basó en los resultados de los experimentos 1 y 2. Picrotoxina fue administrada 90 min antes de la prueba y 30 minutos antes del tratamiento con el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. de acuerdo con protocolos previos (Carro-Juárez et al., 2012; Rodríguez-Landa et al., 2013). Inmediatamente después de la prueba de enterramiento, las ratas fueron evaluadas en el campo abierto para determinar posibles efectos locomotores.

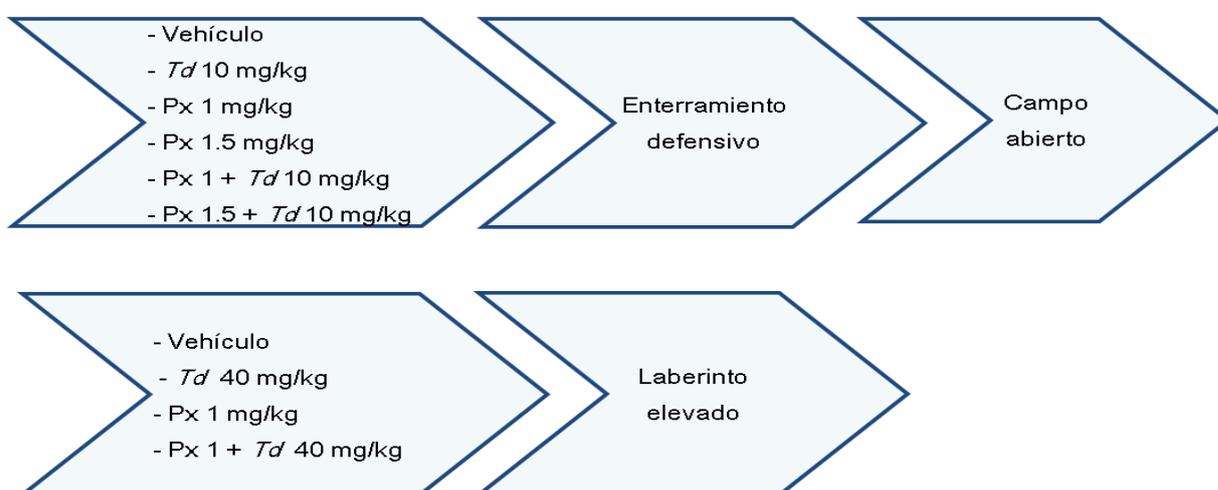


Figura 7. Diagrama que resume el experimento 3.

6.5 Pruebas conductuales

6.5.1 Prueba de laberinto elevado en cruz

El aparato (ver figura 8) está formado por dos brazos abiertos opuestos y dos brazos cerrados opuestos, estos últimos con paredes y techo de acrílico, de tal modo que el dispositivo tiene forma de cruz. Las dimensiones de los brazos abiertos son de 10 x 50 (ancho x largo) y la de los brazos cerrados 10 x 48 x 40 (ancho x largo x alto). El laberinto fue elevado a 50 cm del suelo sobre una base de madera y colocado en un cuarto con iluminación roja de baja intensidad (40 watts). Para evaluar el efecto de los tratamientos, las ratas fueron colocadas en el centro del laberinto y se permitió la exploración por 10 min de acuerdo al protocolo descrito en Fernández-Guasti et al 1999; las variables medidas fueron:

- a) Tiempo que las ratas permanecen en los brazos abiertos del laberinto durante los 10 minutos de prueba. El aumento en el tiempo de permanencia en estos brazos indica una disminución de la ansiedad (Pellow et al., 1985).
- b) Tiempo que las ratas permanecen en los brazos cerrados del laberinto durante los 10 minutos de prueba.
- c) Tiempo acumulado en que las ratas permanecen en el centro del laberinto durante los 10 minutos de prueba.
- d) Número total de entradas que las ratas realizaron a los brazos abiertos del laberinto durante la prueba.
- e) Número total de entradas que las ratas realizaron a los brazos cerrados del laberinto durante la prueba.
- f) Número total de entradas tanto a los brazos abiertos como a los cerrados del laberinto durante la prueba.

Se considera que la rata entró a alguno de estos brazos cuando sus cuatro patas han ingresado completamente. Después de cada sesión el aparato fue cuidadosamente limpiado con una solución jabonosa para remover el olor y residuos de la rata previamente evaluada que de lo contrario podría modificar la conducta espontánea de la rata subsecuente. El análisis conductual se realizó mediante observación directa durante la prueba con ayuda de cronómetros. Posteriormente las ratas fueron reincorporadas a sus cajas de acrílico y trasladadas al bioterio. Los datos se expresaron en el promedio del porcentaje de tiempo que las ratas permanecieron en un área del laberinto (brazos abiertos, cerrados y centro) y la media del número de entradas a los brazos. Los datos del tiempo de permanencia se normalizaron tomando como 100 % la duración de la prueba, mientras que para el número de entradas/cruces se analizaron los valores absolutos.

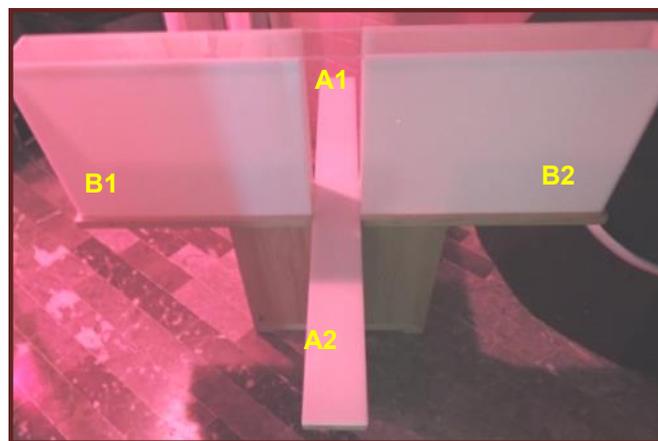


Figura 8. En la figura se muestra dos brazos abiertos opuestos (A1 y A2) que son interceptados por dos brazos cerrados (B1 y B2) con paredes y techo, teniendo en conjunto, la forma de una cruz. Estos brazos están elevados a 50 cm del suelo.

6.5.2 Prueba de enterramiento defensivo

De acuerdo a protocolos previos (Treit et al., 1982, De Boer y Koolhaas, 2003), las ratas fueron habituadas cada uno de los 3 días anteriores al día de prueba. La habituación consistió en colocar a las ratas individualmente durante treinta minutos en una caja de acrílico de 27.3 x 37 x 15.5 cm (ancho x largo x alto) cubierta uniformemente en el suelo con una cama de aserrín de 2 cm de alto. En el día de prueba cada rata se colocó en una caja acrílica con las mismas dimensiones y cantidad de aserrín que la utilizada en la habituación, solo que a diferencia de esta, en el centro de una de las paredes se insertó un electrodo de 0.5 x 7 cm (2 cm arriba de la cama de aserrín) que fue conectado a una fuente de choques eléctricos (LaFayette Instruments, Inc.) (Ver figura 9). Cada vez que la rata tocaba el electrodo recibía un choque eléctrico de bajo amperaje (0.3 mA), cuyo objetivo fue provocar molestia sin inducir daño tisular. El tiempo de cada prueba fue de 10 minutos, las cuales se realizaron en un cuarto de luz roja. Las conductas medidas fueron:

- a) Tiempo de enterramiento: Tiempo que la rata permanece enterrando el electrodo, empujando el aserrín hacia y alrededor del electrodo con movimientos rápidos del hocico y de las patas delanteras. La conducta de enterramiento es considerada como una forma de evitación activa al electrodo y un índice de ansiedad (De Boer et al., 2003).
- b) Latencia de enterramiento: Tiempo que transcurre desde que la rata recibe el primer choque hasta inicio de la conducta de enterramiento. Esta medida se refiere al tiempo que tarda la rata en reaccionar después de recibir el estímulo eléctrico (Rodríguez-Manzo et al., 1999).
- c) Número de choques: Número total de choques que recibió la rata al contacto con el electrodo. Esta medida sirve para identificar cambios en los efectos de

los tratamientos sobre la sensibilidad al estímulo eléctrico y también ha sido utilizada para detectar efectos tipo amnesia (Páez-Martínez et al., 2003).

Las pruebas fueron video grabadas para su posterior análisis. Los datos fueron normalizados respecto al grupo control de cada experimento; donde la conducta desplegada por los animales de este grupo correspondió al 100 %.



Figura 9. Figura que muestra a la rata enterrando el electrodo después de recibir los choques. El electrodo se encuentra insertado en una de las paredes de la caja 2 cm arriba de la cama de aserrín.

6.5.3 Prueba de actividad motriz

Inmediatamente después de la prueba de enterramiento los animales fueron colocados en una caja de acrílico de 33 x 44 x 20 cm marcada en la base con cuadros de 10x10 cm para medir la actividad locomotora durante cinco minutos. Esta actividad se registró mediante el número de cuadros cruzados por la rata (media \pm error estándar de la media). Se considera que la rata paso de un cuadro a otro cuando lo hizo con sus patas traseras (Carro-Juárez et al., 2012). Al igual que en el aparato de la prueba de laberinto elevado, después de cada prueba la caja de

acrílico fue limpiada con una solución jabonosa. Al finalizar las pruebas las ratas fueron reincorporadas a sus cajas de acrílico y trasladadas al bioterio.

Las medidas fueron tomadas mediante observación directa con ayuda de un cronometro y un contador manual. Los datos fueron normalizados tomando como 100 % la actividad locomotriz del grupo control de cada experimento.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados de la curva dosis-respuesta de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. y del antagonista fueron analizados usando la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn. Los resultados del experimento de antagonismo se analizaron con una ANOVA de dos vías que consideró los factores *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. y picrotoxina, la prueba *post-hoc* fue Student-Newman-Keuls. Se usó la prueba U de Mann-Whitney para comparar grupos cuando fue necesario.

7. Resultados

7.1 Prueba de enterramiento defensivo

7.1.1 Experimento 1

En el parámetro tiempo de enterramiento (figura 10A) la prueba Kruskal Wallis indicó diferencias significativas entre los grupos ($H=32.91$, $df=5$, $P<0.001$), posteriormente, con la prueba de Dunn se determinó que el tratamiento con el extracto a las dosis de 5 y 10 mg/kg, y el tratamiento con el diazepam, produjeron una reducción estadísticamente significativa de la conducta ($P<0.05$ en todos los casos) en comparación al grupo vehículo. No hubo diferencias entre el efecto alcanzado con el extracto y el producido por el diazepam a 2 mg/kg ($p>0.05$). A su vez, a partir de la dosis de 20 mg/kg, el extracto no redujo el tiempo de enterramiento (20 mg/kg o 40 mg/kg vs control, $p>0.05$). Por otro lado, ni el diazepam ni las dosis del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. produjeron cambios significativos en la latencia de enterramiento ($H=7.48$, $df=5$, $P=0.18$, figura 10B); el número de choques ($H=6.231$, $df=5$, $P=0.284$, figura 10C) o en la actividad locomotriz ($H=5.06$, $df=5$, $P=0.408$, figura 10D).

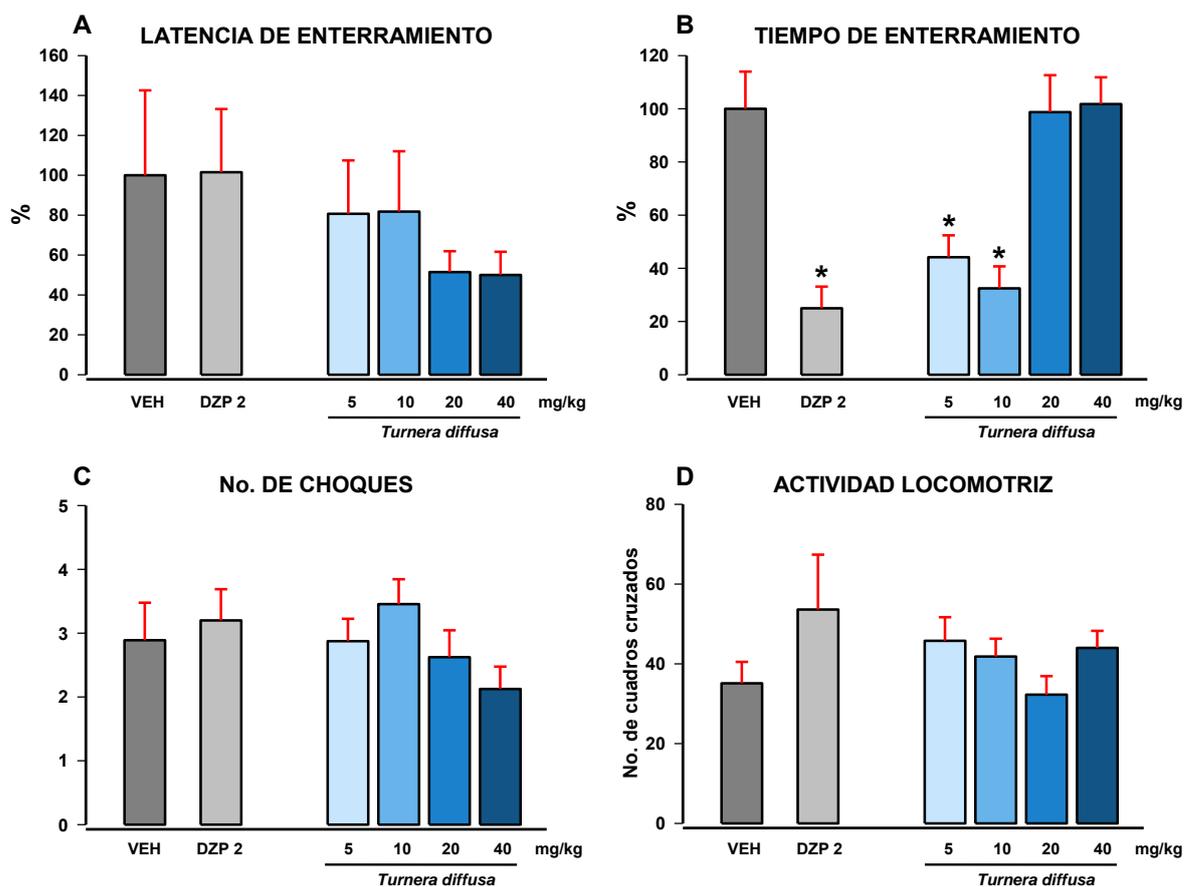


Figura 10. Curva dosis-respuesta de *T. diffusa* Willd. ex Schult. en la pruebas de enterramiento defensivo y campo abierto. Los resultados del tiempo (a) y la latencia de enterramiento (b) se expresan como porcentaje considerando al control vehículo como el 100 %. Los resultados del número de choques (c) y actividad locomotriz (d) se expresan como valores absolutos. Resultados de la prueba de Dunn: * $p < 0.05$, versus el grupo vehículo.

7.1.2 Experimento 2

El tratamiento con el antagonista inespecífico de los receptores $GABA_A$, picrotoxina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg), no modificó de forma estadísticamente significativa los parámetros de tiempo de enterramiento ($H = 2.83$, $df = 3$, $P = 0.41$), latencia de enterramiento ($H = 1.41$, $df = 3$, $P = 0.70$) y número de choques, ($H = 2.7$, $df = 3$, $P =$

0.44). Este tratamiento tampoco produjo cambios en la ambulaci3n evaluada en la prueba de campo abierto ($H= 5.35$, $df= 3$, $P= 0.14$). Por lo tanto, para el estudio de antagonismo se usaron las dosis de 1 y 1.5 mg/kg de picrotoxina.

7.1.3 Experimento 3

El ANOVA de dos v3as no mostr3 efectos significativos en las variables analizadas en la prueba de enterramiento defensivo: tiempo de enterramiento (factor *Turnera* $F=1.85$, $df 1,45$, $p=0.18$; factor picrotoxina $F=1.47$, $df 2,45$, $p= 0.24$; interacci3n $F=2.2$, $df 2,45$, $p=0.12$), latencia de enterramiento (factor *Turnera* $F =2.04$, $df 1,45$, $p=0.16$; factor picrotoxina $F=0.32$, $df 2,45$, $p= 0.72$; interacci3n $F=0.6$, $df 2,45$, $p= 0.54$) y n3mero de choques (factor *Turnera* $F=1.74$, $df 1,45$, $p=0.19$; factor picrotoxina $F=1.33$, $df 2,45$, $p=0.27$; interacci3n $F=0.75$, $df 2,45$, $p=0.47$). Los resultados de actividad locomotora en campo abierto tampoco mostraron diferencias significativas con este an3lisis (factor *Turnera* $F=0.02$, $df 1,45$, $p=0.87$; picrotoxina $F=0.53$, $df 2,45$, $p= 0.59$; interacci3n $F=1.25$, $df 2,45$, $p= 0.29$).

Con base en estos resultados se decidi3 utilizar la prueba U de Mann-Whitney para realizar comparaciones pareadas entre los grupos *T. diffusa* Willd. ex Schult. + veh3culo, *T. diffusa* Willd. ex Schult. + picrotoxina 1 mg/kg y *T. diffusa* Willd. ex Schult. + picrotoxina 1.5 mg/kg.

Se encontr3 que 3nicamente la dosis de 1.5 mg/kg de picrotoxina, impidi3 el efecto ansiol3tico de *T. diffusa* Willd. ex Schult. 10 mg/kg. La combinaci3n del antagonista 1.5 mg/kg con *T. diffusa* Willd. ex Schult. 10 mg/kg aumento significativamente el tiempo de enterramiento comparado al grupo al que solo se le administro *T. diffusa* Willd. ex Schult. (picrotoxina 1 mg/kg, $p= 0.64$, picrotoxina 1.5

mg/kg $p=0.02$, figura 11A). Con este análisis no se encontró efectos por antagonista en la latencia de enterramiento (picrotoxina 1 mg/kg, $p= 0.418$, picrotoxina 1.5 mg/kg $p=0.416$, figura 11B), el número de choques (picrotoxina 1 mg/kg, $p= 0.97$, picrotoxina 1.5 mg/kg $p=0.69$, figura 11C) y la actividad locomotriz (picrotoxina 1 mg/kg, $p= 0.17$, picrotoxina 1.5 mg/kg $p=0.51$, figura 11D).

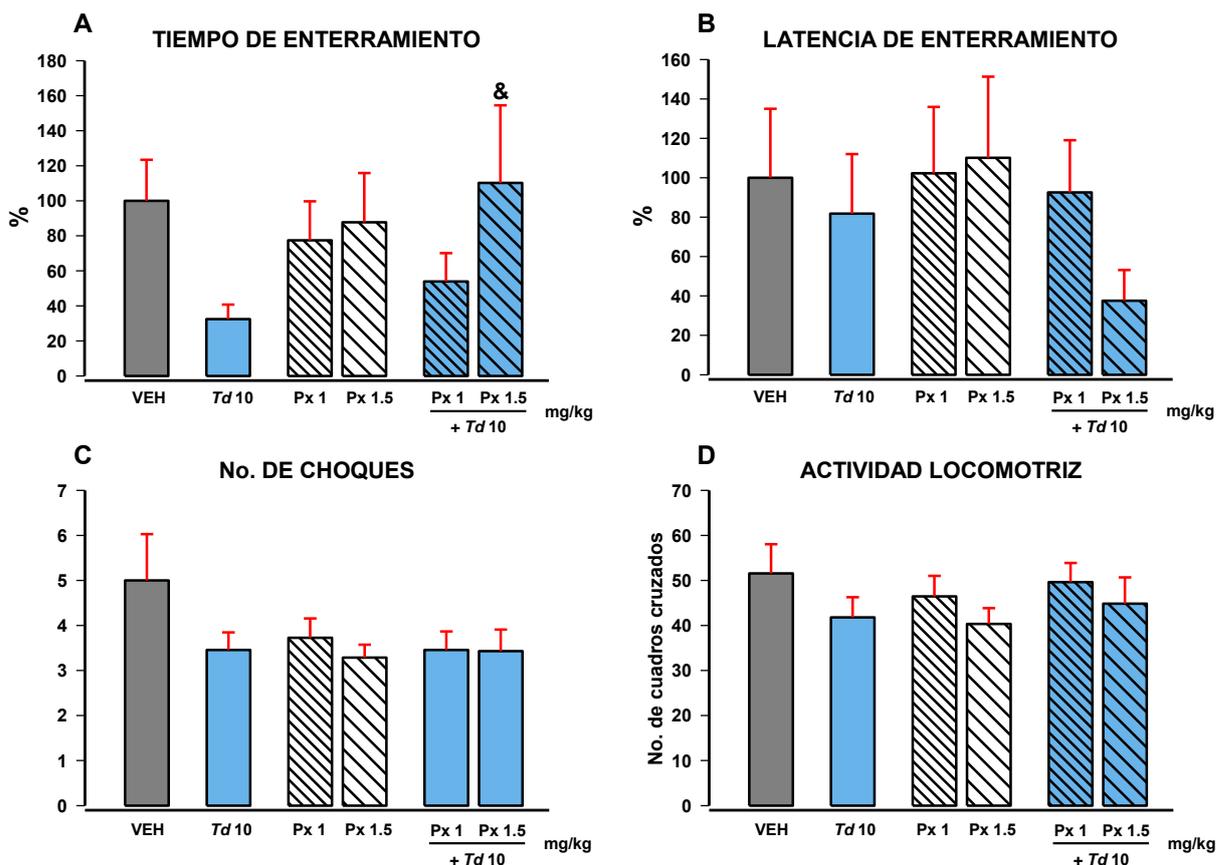


Figura 11. Efecto de la combinación de *T. diffusa* Willd. ex Schult. y picrotoxina en las pruebas de enterramiento defensivo y campo abierto. Los resultados del tiempo (a) y la latencia de enterramiento (b) se expresan como porcentaje considerando al control vehículo como el 100 %. Los resultados del número de choques (c) y actividad locomotriz (d) se expresan como valores absolutos. Resultados de la prueba U de Mann Whitney: $&p < 0.05$ versus el grupo *T. diffusa* Willd. ex Schult. 10 mg/kg.

7.2 Prueba de laberinto elevado en cruz

7.2.1 Experimento 1

En el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto hubo diferencias significativas entre los grupos ($H= 19.20$, $df= 6$, $P= 0.004$, figura 12A), la prueba *post hoc* de Dunn no reveló el origen de dichas diferencias; sin embargo, un análisis posterior con la prueba de U de Mann-Whitney indicó que la dosis de 40 mg/kg del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. produjo en las ratas un aumento estadísticamente significativo del tiempo de permanencia en estos brazos, un efecto parecido al que produjo diazepam ($p<0.05$ en ambos casos, figura 12B).

En el tiempo de permanencia en los brazos cerrados del laberinto también hubo diferencias significativas entre los grupos ($H= 18.39$, $df= 6$, $P= 0.005$, figura 12B), al igual que en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, la prueba de U de Mann-Whitney indicó que de forma paralela, diazepam y *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. 40 mg/kg produjeron una disminución del tiempo que los animales permanecieron en los brazos cerrados ($p<0.05$ en ambos casos, figura 12B). Los tratamientos no modificaron de forma estadísticamente significativa ni el tiempo de permanencia en el centro del laberinto ($H= 5.05$, $df= 6$, $P= 0.53$, figura 12C) ni el número de cruces totales durante los 10 minutos de la prueba ($H= 9.26$, $df= 6$, $P=0.15$, figura 12D).

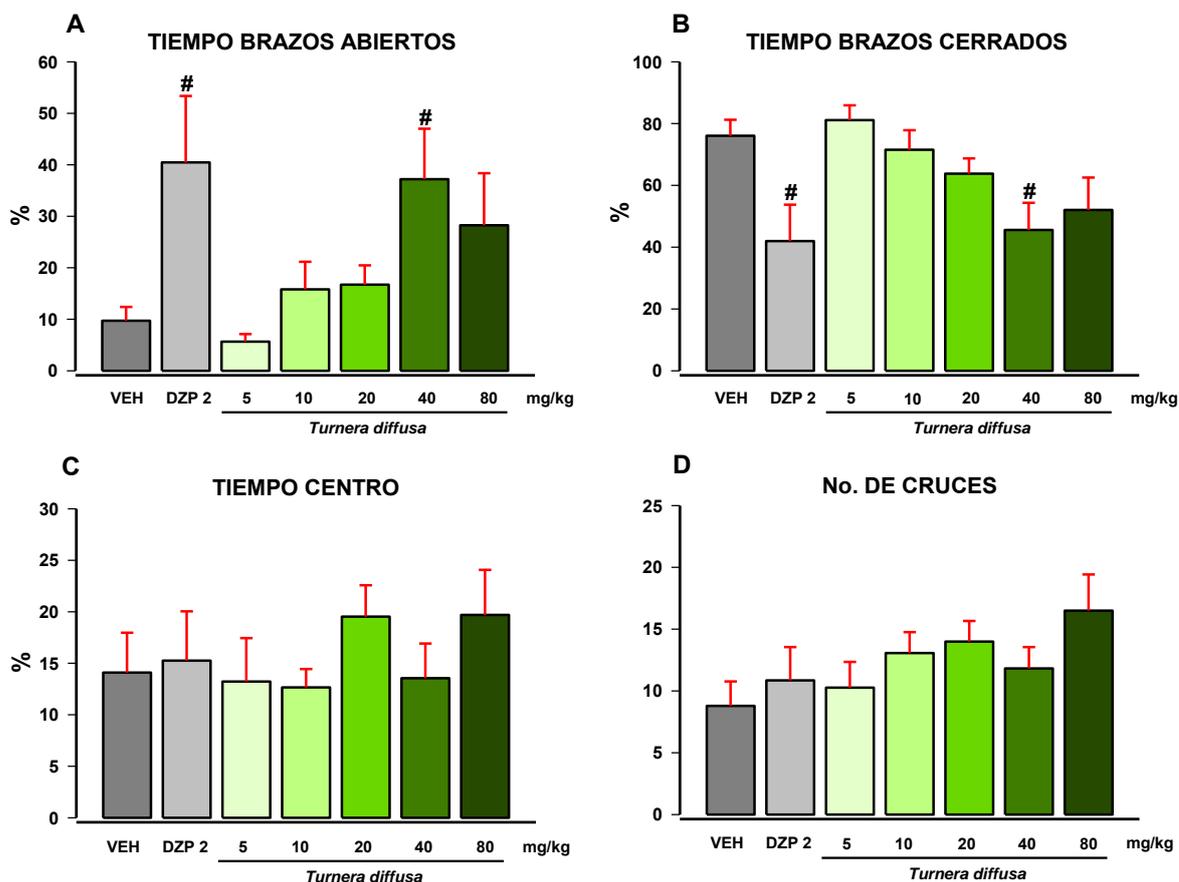


Figura 12. Efecto de las diferentes dosis de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en el laberinto elevado en cruz. Los resultados del tiempo de permanencia en las diferentes partes del laberinto se expresan como porcentaje respecto a los 600 segundos de prueba (100 %). Los resultados del número de cruces se expresan como valores absolutos. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney: # $p < 0.05$ versus vehículo.

7.2.2 Experimento 2

El tratamiento con picrotoxina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg) modificó de forma estadísticamente significativa el tiempo que las ratas permanecieron en los brazos abiertos del laberinto ($H = 13.07$, $df = 3$, $P = 0.004$). La prueba de Dunn indicó que sólo la dosis de 0.5 mg/kg de picrotoxina ($p < 0.05$) redujo significativamente el tiempo de permanencia en esta área del laberinto, sugiriendo un efecto ansiogénico.

Ninguna de las dosis del antagonista alteró de forma significativa el tiempo de permanencia en los brazos cerrados ($H= 3.96$, $df= 3$, $P= 0.26$) o el tiempo en el centro del laberinto ($H= 4.35$, $df=3$, $P= 0.22$). Finalmente, el tratamiento con las diferentes dosis de picrotoxina modificó el número de cruces totales durante la prueba ($H= 11.076$, $df= 3$, $P= 0.011$), el análisis *post hoc* (prueba de Dunn) indicó que las dosis de 0.5 y 1 mg/kg del antagonista ($p<0.05$) redujeron este parámetro. Con base en estos resultados, para el estudio de antagonismo, se eligieron las dosis de 1 y 1.5 ya que éstas no produjeron efectos ansiolíticos ni ansiogénicos en este modelo.

7.2.3 Experimento 3

En el tiempo de permanencia en brazos abiertos, el ANOVA de dos vías mostró efectos por el tratamiento con extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. ($F= 7.04$, $df= 1$, $37 p= 0.012$), el tratamiento con el antagonista ($F= 7.51$, $df= 1$, $37 p= 0.009$) y por la interacción de ambos factores ($F= 4.22$, $df= 1$, $37 p= 0.047$). El análisis *post hoc* mediante la prueba de Student-Newman-Keuls, indicó que el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult 40 mg/kg tuvo un efecto ansiolítico, pues hubo un aumento significativo del tiempo de permanencia en esta parte del laberinto ($p<0.05$, figura 13A) comparado con el grupo control, además indicó que este efecto fue bloqueado con picrotoxina 1 mg/kg, ya que las ratas que recibieron la combinación de extracto y antagonista mostraron un menor tiempo de permanencia en los brazos abiertos en comparación con el grupo tratado sólo con el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult ($p<0.05$, figura 13A). Respecto al tiempo de permanencia en brazos cerrados y el número de cruces totales, el ANOVA de dos vías mostró algunos efectos significativos determinados por el antagonista pero no por el extracto o la interacción de ambos factores (Tiempo en brazos cerrados: factor

Turnera F=2.6, df 1,37, p= 0.11; factor picrotoxina F=4.3, df 1,37, p=0.04; interacción F=2.5, df 1,37, p=0.11. Número de cruces totales en el laberinto: factor Turnera F=1.10, df 1,37, p= 0.3; factor picrotoxina F=9.82, df 1,37, p=0.003; interacción F=2.26, df 1,37, p=0.14. Figura 13D). El tiempo en el centro no fue afectado por los tratamientos de extracto acuoso y el antagonista (factor Turnera F=1.7, df 1,37, p=0.19; factor picrotoxina F=0.45, df 1,37, p=0.5; interacción F=0.19, df 1,37, p=0.66; figura 13C).

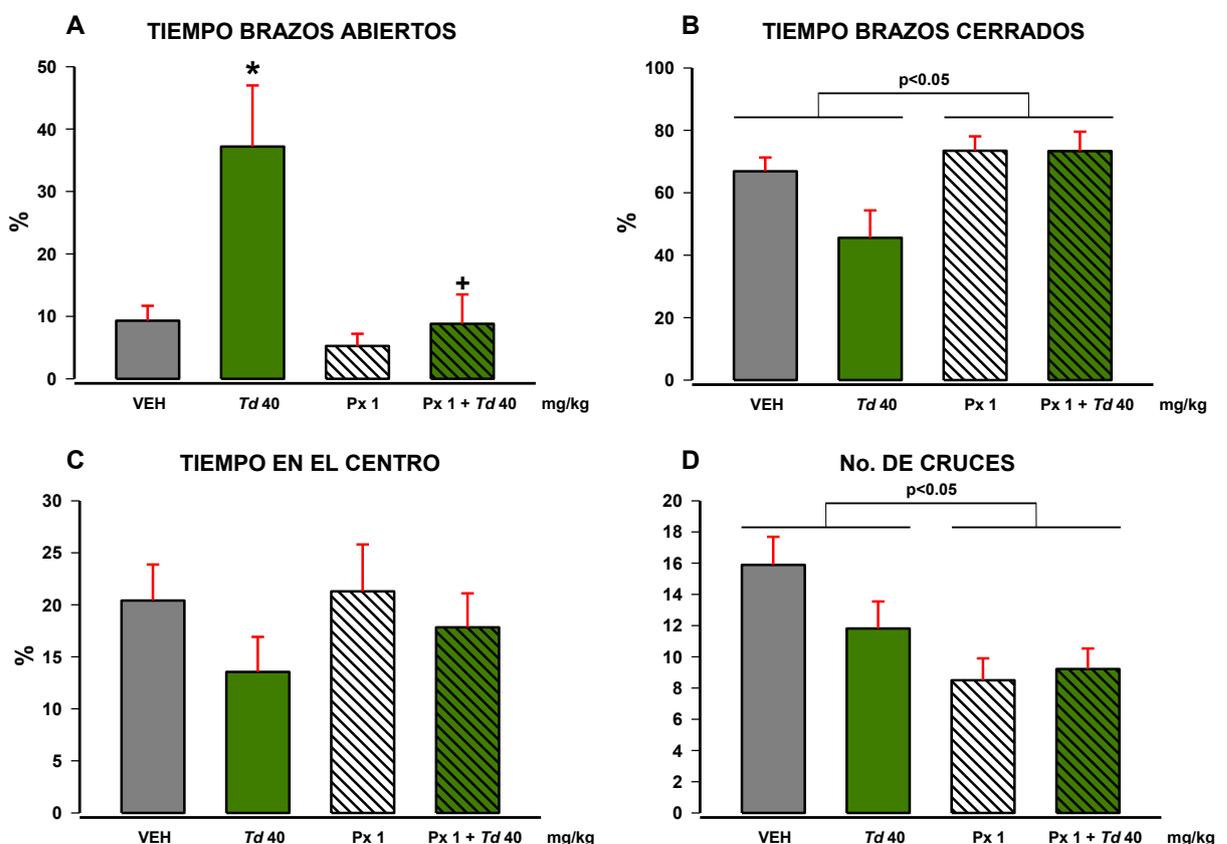


Figura 13. Efecto de la combinación de *T. diffusa* Willd. ex Schult. y picrotoxina en el laberinto elevado en cruz. Los resultados del tiempo de permanencia en las diferentes partes del laberinto se expresan como porcentaje respecto a los 600 segundos de prueba (100 %). Los resultados del número de cruces se expresan como valores absolutos. Resultados de la prueba de Student-Newman-Keuls: * p<0.05 versus el grupo control, + p<0.05 versus *T. diffusa* Willd. ex Schult. 40 mg/kg.

8. Discusión

Los resultados del presente trabajo indican que el extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. produjo un efecto ansiolítico tanto en la prueba de enterramiento defensivo como en la prueba de laberinto elevado en cruz, similar a lo inducido por diazepam. La dosis ansiolítica del extracto fue diferente entre los dos modelos, además se observó que las dosis más altas perdieron su efecto.

El experimento con el antagonista inespecífico de los receptores GABA_A, picrotoxina, confirmó que el efecto ansiolítico del extracto acuoso se llevó a cabo a través de su interacción con los receptores GABA_A.

8.1 Modelos animales para el estudio de la ansiedad

Los modelos empleados en este trabajo, laberinto elevado en cruz y enterramiento defensivo, presentan muchas ventajas, pues no requieren de entrenamiento, no implican procesos complejos como el aprendizaje-memoria, hambre-sed o mecanismos nociceptivos (Gómez et al., 2002), permite ensayar en ellos diversas manipulaciones experimentales que en los seres humanos no sería posible; además, cuando se exploran extractos o sustancias obtenidas, por lo regular en cantidades pequeñas, de diferentes órganos de las plantas, el uso de estos modelos animales permite su óptimo empleo. Estos modelos han sido útiles en la Psiquiatría ya que han generado información sobre los mecanismos cerebrales y conductuales que podrían estar involucrados en la etiología y fisiopatología de los trastornos ansiosos, también han sido utilizados para el desarrollo de tratamientos farmacológicos nuevos y más eficientes (Rejón-Orantes et al., 2011). A pesar de estas ventajas, estos modelos animales no abordan lo patológico, sino sólo las formas extremas de

ansiedad que están en un rango normal y adaptativo; además, los fármacos son administrados comúnmente de forma aguda. Esto contrasta con lo que ocurre en la clínica, donde generalmente son crónicos tanto el padecimiento como el tratamiento, por lo que se podría asegurar que estos modelos no resultan satisfactorios cuando se confrontan con los síndromes clínicos (Steimer, 2011). Sin embargo, se ha conceptualizado a los desórdenes de ansiedad humana como desórdenes de defensa, en los que la característica principal tiene que ver con una actividad inapropiada de la conducta defensiva derivada de una evaluación errónea del daño (Rodgers et al., 1997); esta respuesta conductual es similar en otras especies de vertebrados, ya que los sistemas neurales que intervienen para detectar el peligro y producir respuestas defensivas están evolutivamente conservados y son bastante similares en todas las especies de vertebrados (Gómez, et al., 2002). De esta forma, el estudio de la ansiedad humana se puede llevar a cabo a través del repertorio típico de las especies, mediante el empleo de modelos animales con alta validez y confiabilidad. Además, la buena validación farmacológica de estas pruebas claramente refuerza la idea de que la ansiedad normal y la patológica involucran por lo menos en parte un substrato neurobiológico común.

8.2 El extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. produce efectos ansiolíticos en dos modelos de ansiedad

En este trabajo, las dosis de 5 y 10 mg/kg del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. disminuyeron significativamente el tiempo de enterramiento, sugiriendo un efecto ansiolítico. Estas dosis no alteraron la latencia de enterramiento ni el número de choques, es decir, no se modificó el tiempo de reacción ante el choque eléctrico o la respuesta al estímulo doloroso. Los resultados respecto al número de choques

indican que el extracto no produce efectos sobre la memoria ni la nocicepción, pues como se menciono anteriormente, este parámetro nos indica cambios sobre la sensibilidad al estímulo eléctrico y también sobre efectos tipo amnesia. Adicionalmente, en la prueba de campo abierto, la cual nos indica si el tratamiento administrado está produciendo algún cambio en su actividad motriz (hipo o hiperactividad) no hubo cambios con ninguna de estas dosis. Con todos estos parámetros se concluye que el extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. a las dosis de 5 y 10 mg/kg produce un efecto ansiolítico que no se debe a sedación, efectos locomotores incapacitantes, o cambios en la nocicepción.

En el laberinto elevado, el tratamiento con el extracto incrementó gradualmente el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y alcanzó un efecto significativo con la dosis de 40 mg/kg. En paralelo, el tiempo de permanencia en los brazos cerrados fue disminuido significativamente, mientras que el tiempo en el centro y el número de cruces (indicador de la actividad motora de las ratas) no cambiaron. Con estos resultados se concluye que la dosis de 40 mg/kg del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. produjo un efecto ansiolítico parecido a diazepam, que no se debió a cambios motores en las ratas.

8.3 El extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. produce efectos bifásicos en dos modelos de ansiedad

En la prueba de enterramiento defensivo el extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. produjo efectos bifásicos sobre la conducta defensiva. A las dosis más altas (20 y 40 mg/kg) el tratamiento con el extracto perdió su capacidad para reducir el tiempo de enterramiento, ya que el tiempo que las ratas enterraron con estas dosis fue significativamente mayor comparado a lo producido por diazepam o a las dosis

de 5 y 10 mg/kg del extracto, pero similar a lo que se observó con el grupo control. En los parámetros de latencia de enterramiento, número de choques y actividad motriz no se observaron cambios significativos con estas dosis. De esta forma, se concluye que sus efectos no se deben a hiperactividad ni a alteraciones en la percepción del estímulo doloroso o en el tiempo de reacción al estímulo. En la prueba de laberinto elevado se observó que la dosis más alta del extracto (80 mg/kg) no produjo un efecto ansiolítico, pues no hubo un aumento significativo del tiempo en los brazos abiertos, lo cual no implicó menor actividad motriz, observada a través del número de cruces totales. Los resultados en conjunto, sugieren que el extracto acuoso produce una respuesta bifásica en ambos modelos, respuesta que podría ser explicada por los efectos tipo horméticos (Calabrese, 2008). Esta respuesta se presenta predominantemente con los fármacos ansiolíticos independientemente del modelo animal utilizado, los agentes probados, la vía de receptores por los que actúan y las especies y cepas utilizadas. En este tipo de respuesta, los fármacos actúan en dos sitios: a) sitio estimulador de alta afinidad y b) sitio inhibitorio de baja afinidad. Hay por lo tanto, una falta o disminución del efecto ansiolítico producido por las dosis mayores, como se observó en este trabajo.

8.4 Los receptores GABA_A participan en el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult.

Para poner a prueba la hipótesis de la participación de los receptores GABA_A en el efecto ansiolítico producido por el extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult., inicialmente se comparó su respuesta con la del fármaco de referencia diazepam (2 mg/kg).

Los resultados indican que en ambos modelos los efectos de este agonista de los receptores GABA-benzodiacepinas fueron similares a los de *T. diffusa* Willd. ex Schult. en las pruebas de enterramiento defensivo (5-10 mg/kg) y laberinto elevado (40 mg/kg). Esto sugiere que ambos tratamientos comparten el mismo mecanismo de acción, que es facilitar la neurotransmisión GABAérgica (Rodgers et al., 1997, Carro-Juárez et al., 2012). Los resultados se confirmaron con el tercer experimento de este trabajo, que incluye el uso de un antagonista inespecífico de los receptores GABA_A, picrotoxina. Inicialmente, se determinó en el experimento 2, que las dosis de 1 y 1.5 mg/kg de picrotoxina fueron las adecuadas para el estudio del antagonismo porque por sí mismo no modificaban la conducta en las pruebas de ansiedad.

En la prueba de enterramiento defensivo, el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. (10 mg/kg) fue revertido con picrotoxina 1.5 mg/kg, pues el tiempo de enterramiento en el grupo tratado con la combinación, fue aumentado significativamente comparado al grupo al que sólo se le administró *T. diffusa* Willd. ex Schult. 10 mg/kg. Este valor del tiempo de enterramiento fue similar a lo que se observó con el grupo control vehículo. Por otro lado, la combinación del extracto más el antagonista (dosis efectiva) redujo significativamente la latencia de enterramiento respecto al grupo control vehículo.

A partir de estos resultados se dedujo que picrotoxina fue capaz de antagonizar el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult., aunque redujo el tiempo de reacción de los animales ante el choque eléctrico recibido.

En la prueba de laberinto elevado, el efecto ansiolítico producido con la dosis de 40 mg/kg del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. fue antagonizado con la dosis de 1 mg/kg de picrotoxina, ya que el tiempo de permanencia en los brazos abiertos fue disminuido significativamente. Esta reversión observada con la

combinación de *T. diffusa* Willd. ex Schult. y el antagonista fue similar a lo producido por el grupo control vehículo y el grupo administrado con picrotoxina 1 mg/kg. El menor tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el grupo administrado con la combinación de tratamientos se asoció a un mayor tiempo en los brazos cerrados. Por otro lado, en el tiempo de permanencia en el centro y en el número de cruces totales no hubo cambios significativos.

Por otra parte, el antagonista no modificó la conducta en la prueba de enterramiento defensivo, mientras que en la prueba de laberinto sólo la dosis más baja (0.5 mg/kg) disminuyó significativamente el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, es decir un posible efecto ansiogénico. Los animales tratados con 0.5 mg/kg de picrotoxina también mostraron una disminución significativa de la actividad locomotriz expresada en bajo número de cruces en el laberinto, por lo que el resultado también podría interpretarse como hipoactividad locomotriz. Sin embargo, la dosis de 1 mg/kg de picrotoxina también disminuyó el número de cruces en el laberinto, pero sin producir efectos en el tiempo de permanencia en brazos abiertos o cerrados, por lo que es posible que la dosis más baja del antagonista haya inducido efectos ansiogénicos.

Para antagonizar el efecto ansiolítico del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. en la prueba de laberinto elevado en cruz se requirió de una dosis de 1 mg/kg de picrotoxina, lo cual coincide con los reportes previos (Treit et al., 1982; Carro-Juárez et al., 2012); sin embargo, en la prueba de enterramiento defensivo se necesitaron 1.5 mg/kg para producir tal efecto. Una posible explicación de esta diferencia en las dosis antagonistas efectivas de la picrotoxina, es que los modelos utilizados en este trabajo no son equivalentes en términos del estado o

reacción emocional inducida, por lo que expresan diferentes tipos de conductas relacionadas a ansiedad, las cuales podrían tener una regulación neuroquímica diferente (Gómez et al. 2002). El extracto podría unirse a diferentes sitios del complejo receptor GABA-benzodiacepina (sitio de unión para BZD, canal de Cl⁻, sitio de unión a GABA) para reducir la ansiedad en uno u otro modelo. Dependiendo de esto es que se requeriría una dosis diferente de picrotoxina, que es un antagonista con acciones directas en el canal de Cl. Es necesario hacer experimentos específicos para poner a prueba esta hipótesis, utilizando antagonistas específicos para los diferentes sitios de unión del receptor.

8.5 Diferencias en el efecto farmacológico entre diazepam y el extracto

Respecto a cómo se producen los efectos ansiolíticos, los resultados actuales sugieren que la eficacia entre el diazepam (2 mg/kg) y el extracto es similar en ambos modelos de ansiedad. Sin embargo, existen diferencias en la potencia farmacológica ya que la dosis de diazepam que produjo el efecto fue más baja. Con los resultados en ambas pruebas podemos sugerir que la potencia farmacológica entre diazepam y *T. diffusa* fue más parecida en el enterramiento defensivo que en el laberinto. Las razones de estas diferencias se establecen con base en que el diazepam es un fármaco puro, mientras que el extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. es una mezcla de metabolitos secundarios de la planta, los cuales están presentes en baja concentración.

8.6 Efecto de metabolitos de *T. diffusa* Willd. ex Schult.

De acuerdo con estudios previos, el extracto acuoso contiene predominantemente flavonoides como apigenina y luteolina, el glucósido fenólico arbutina, gluconato de sodio y cafeína (Estrada-Reyes et al., 2009). De estos compuestos, se demostró que el flavonoide apigenina (2 mg/kg), identificado en un extracto metanólico de las partes aéreas de *Turnera aphrodisiaca* Ward, produjo un efecto ansiolítico en tres modelos animales de ansiedad en ratón (Kumar et al., 2008). Este trabajo también demuestra que la apigenina tiene ligeros efectos sedantes (12 veces más que la dosis ansiolítica) y un efecto analgésico comparable al de la morfina; pero carece de actividad antidepresiva, anti estrés y anticonvulsiva. La evidencia sugiere que la apigenina podría actuar por un mecanismo complejo sobre algunos de los sitios del receptor GABA_A, pero no en el sitio para convulsivantes, y posiblemente por un mecanismo opioidérgico. En otro estudio (Viola et al., 1995), se demostró que apigenina (5,7,4'-trihidroxi flavona), obtenida de una fracción del extracto acuoso de las hojas de *Matricaria recutita* L. se unió a los receptores centrales de benzodiazepinas y produjo efectos ansiolíticos en ratones en el modelo de laberinto elevado, con presencia de leves efectos sedantes a dosis altas, pero no efectos anticonvulsivos o miorrelajantes. Sin embargo, en ratas los efectos reportados para apigenina son contrarios a los hallados en ratones. En el estudio de Avallone et al. (2000) se demostró que una fracción, obtenida de un extracto metanólico de las flores de *Matricaria chamomilla* L., en la que se identificó apigenina, no produjo acciones ansiolíticas en el modelo de laberinto elevado (dosis de 0.5 a 10 mg/kg), miorrelajantes ni anticonvulsivas en ratas, pero sí una inhibición de la conducta locomotora (25 y 50 mg/kg) que no fue atribuida a una interacción con el receptor GABA_A. Este estudio es similar al de Zanolini et al., (2000) pues también se observó

en ratas que apigenina (25 mg/kg) no produjo un efecto ansiolítico en el modelo luz-oscuridad pero si un efecto sedante que no fue atribuido a una interacción con los receptores GABA-benzodiacepinas. Finalmente, Zhao et al. (2008) demostró que los metabolitos de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., 7-glucosido de apigenina, Z-equinacina y pinocembrin tienen actividad estrogénica sobre receptores a estrógenos alfa, pero más débil respecto al 17 β -estradiol, en células de hepatoma humano (HepG2). El estradiol produce efectos ansiolíticos en algunos modelos animales, pero a la fecha este mecanismo no se ha explorado en animales vivos tratados con el extracto. Con esta evidencia no podemos afirmar que apigenina es el componente ansiolítico del extracto de estudio. Para confirmar su participación deberíamos realizar experimentos de dosis-respuesta de apigenina en los modelos que describe esta tesis.

Por otro lado, en un estudio de Coleta et al. (2006), se demostró que luteolina-7-O-[2-ramnosilglucosido], aislada de una fracción del extracto acuoso de *Passiflora edulis* Sims, produjo un efecto ansiolítico en ratones en el modelo de laberinto elevado sin presentar efectos sobre la actividad motora. En un estudio posterior de Coleta et al. (2008) se encontró que la flavona luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) probada en ratones produjo efectos ansiolíticos con la dosis de 5 mg/kg sin producir efectos anticonvulsivos y presentó poca afinidad por los receptores a benzodiacepinas. Estos estudios sugieren que el compuesto luteolina podría tener una participación en la actividad ansiolítica del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult.

Otro de los principales constituyentes del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. es cafeína. Este compuesto, al contrario del efecto producido por

los flavonoides anteriormente mencionados, induce efectos ansiogénicos. Estudios han demostrado que la cafeína, antagonista del receptor de adenosina, causa comportamientos de ansiedad mediante el aumento de la actividad de renina en plasma, así como la elevación de los niveles de catecolaminas plasmáticas (Patki et al., 2015). Además se han realizado estudios en modelos animales de ansiedad, como el laberinto elevado en cruz, la prueba de interacción social (Baldwin et al., 1989; Bhattacharya et al., 1997), y en la prueba de campo abierto (Bhattacharya et al., 1997), que confirman su efecto ansiogénico.

Por otro lado, no se han realizado estudios de los demás principales constituyentes del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., como son: arbutina, damianina, gonzalitozina y acacetina, los cuales también podrían estar involucrados en el efecto ansiolítico del extracto.

8.7 Diferencias de acuerdo al modelo animal de ansiedad

Aunque ambas pruebas fueron sensibles al extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult., produciendo un efecto ansiolítico, las dosis efectivas no fueron equivalentes (5 y 10 mg/kg para la prueba de enterramiento y 40 mg/kg para la prueba de laberinto elevado). Por el contrario, la dosis ansiolítica efectiva de diazepam fue igual en ambos modelos (2 mg kg).

Una explicación de esta diferencia en dosis ansiolíticas del extracto pueden ser las variaciones del estado emocional inducido por cada modelo animal. Se sabe que los animales reaccionan a las situaciones o estímulos adversos dependiendo de

la naturaleza de estos, de las oportunidades conductuales y del repertorio de las especies. Así, los modelos utilizados en este trabajo no son equivalentes en términos del estado o reacción emocional inducida, de esta forma, se expresan diferentes tipos de conductas relacionadas a ansiedad, las cuales podrían tener una regulación neuroquímica diferente (Gómez et al. 2002). Existen dos diferentes estrategias de enfrentamiento: las activas y las pasivas, las cuales son mediadas por circuitos cerebrales específicos. Por un lado, las estrategias de enfrentamiento activas, como lucha y huida, son utilizadas cuando es posible escapar de la amenaza, la cual se encuentra muy cercana. Los cambios autonómicos asociados con estas estrategias activas están mediados predominantemente por la actividad simpática (hipertensión y taquicardia). Por otro lado, las estrategias de enfrentamiento pasivas son suscitadas cuando no es posible escapar de la amenaza, la cual se encuentra distante y es predictiva de peligro. Este tipo de estrategia está caracterizada por una usual inhibición autonómica (hipotensión y bradicardia) y con un aumento más pronunciado en la respuesta neuroendocrina. Se ha considerado que la ansiedad es marcadamente mayor cuando la estrategia de enfrentamiento pasivo es más usada, o cuando la acción es inhibida, incluso momentáneamente (Steimer, 2011). Tomando como referencia lo que menciona este autor, podemos deducir que se requirió mayor dosis del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. en los animales probados en el laberinto elevado, donde se despliega una conducta de evitación o de inhibición de la exploración, relacionada con la evitación de un peligro ambiental potencial (Gómez et al., 2002), que en la prueba de enterramiento defensivo donde se despliega predominantemente una conducta de enfrentamiento activa, la cual, probablemente esté produciendo un menor índice de ansiedad. Aunque este argumento parece ser interesante, habría

que evaluar el efecto del extracto sobre los niveles de corticosterona de las ratas en ambos modelos de ansiedad.

En cuanto al papel de estructuras cerebrales en los modelos animales utilizados en el actual trabajo, se demostró en un estudio de Treit et al., 1993, por un lado, en la prueba de enterramiento defensivo, que una lesión al septum disminuyó significativamente el tiempo de enterramiento del electrodo, mientras que una lesión en la amígdala significativamente aumentó el número de choques inducidos por contacto. Esta discapacidad de evitar la sonda de choque es por lo común visto con drogas ansiolíticas y es consistente con la reducción de la ansiedad. Otros estudios han mostrado que especialmente las partes posteriores de la región septal, el hipocampo dorsal, el núcleo accumbens (región *shell*) y el núcleo del rafe dorsal son críticas para el circuito neural subyacente a la expresión de enterramiento defensivo.

En la prueba de laberinto elevado, se demostró que el incremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos está asociado a una lesión del septum, respuesta similar al que producen los fármacos ansiolíticos, sugiriendo la participación de esta área en la expresión de la ansiedad. Estudios posteriores con este modelo han demostrado que otras estructuras cerebrales como la amígdala central y el núcleo del rafe dorsal, así como receptores de GABA, juegan un papel importante en la ansiedad. En un estudio de Gonzales y File, (1997) se mostró que la administración de midazolam en el núcleo del rafe dorsal produjo efectos ansiolíticos. En otro estudio de Gonzales et al., (1998), se mostró que tanto el hipocampo dorsal como el núcleo del rafe medial no están involucrados en la ansiedad en el laberinto, puesto que una administración de midazolam y flumazenil, no produjo cambios en las medidas de ansiedad. Por otro lado, los estudios de

Moreira et al. (2007) y Carvalho et al. (2012) demostraron la participación del núcleo central de la amígdala central, pero no el núcleo basolateral, en la conducta exploratoria de los roedores en el modelo de laberinto elevado, ya que la inyección de muscimol en la primera estructura causó efectos ansiolíticos.

De acuerdo con Pesold y Treit (1995) la infusión de midazolam (agonista de los receptores a benzodiazepinas) en la amígdala central mejora el acercamiento de los animales al electrodo en este modelo, pero no incrementa el tiempo en brazos abiertos. Mientras que la administración del mismo agonista en la amígdala basolateral incrementa el tiempo en brazos abiertos en el laberinto pero no reduce la ansiedad en la prueba de enterramiento defensivo. Los datos sugieren que los efectos de un agonista del receptor GABA_A podrían variar en relación al modelo de ansiedad utilizado, desde producir efectos opuestos como los mostrados por Pesold y Treit (1995) hasta efectos ansiolíticos asociados a la dosis, como en el caso del extracto acuoso evaluado en el presente estudio.

9. Conclusiones

- *T. diffusa* Willd. ex Schult. produjo un efecto ansiolítico, mediado por receptores GABAA, en ambos modelos animales.
- El efecto del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. fue específico para conducta tipo ansiedad en ambos modelos, ya que el tratamiento no modificó la motricidad, el tiempo de reacción o la percepción de estímulos dolorosos.
- El efecto ansiolítico del extracto acuoso de *T. diffusa* Willd. ex Schult. se produjo de forma bifásica y con variaciones en la potencia farmacológica que podrían estar asociadas al modelo animal y a los componentes del extracto.

10. Perspectivas

- Determinar si el extracto acuoso regula diferencialmente los niveles de corticosterona en plasma de ratas sometidas a las pruebas de laberinto elevado y enterramiento defensivo.
- Evaluar que constituyentes del extracto acuoso de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. participan en el efecto ansiolítico.
- Determinar la vía por la cual dichos constituyentes están ejerciendo el efecto ansiolítico.

11. Referencias

1. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
2. <http://www.tropicos.org/Home.aspx>
3. Adhikari A. Distributed circuits underlying anxiety. *Frontiers in behavioral Neuroscience*. 2014. 8: 1-6.
4. Alarcon-Aguilara F.J., Roman-Ramos R., Perez-Gutierrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C.C., Flores Saenz J.L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998. 61: 101-110.
5. Alarcon-Aguilar F.J., Roman-Ramos R., Flores-Saenz J.L., Aguirre-García F. Investigation on the Hypoglycaemic Effects of Extracts of Four Mexican Medicinal Plants in Normal and Alloxan-diabetic Mice. *Phytotherapy Research*. 2002. 16: 383-386.
6. Alcaraz-Meléndez L., Delgado-Rodríguez J., Real-Cosío S. Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*. 2004. 75: 696-701.
7. Alvarado-Cárdenas L. Turneraceae. En: Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM. 2006. 43: 1-7.
8. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Quinta edición. Washington DC. 2013. 947pp.
9. Amiel J., Mathew S., Garakani A., Neumeister A., Charney D. Neurobiology of Anxiety Disorders. En: The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology. Schatzberg A., Nemeroff C (editores). Cuarta edición American Psychiatric Publishing. Washington DC. 2009. Capítulo 47: 1616.
10. Arletti R., Benelli A., Cavazzuti E., Scarpetta G., Bertolini A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Ptaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology*. 1999. 143: 15-19.

11. Avallone R., Zanolli P., Puia G., Kleinschnitz M., Schreier P., Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Pharmacology*. 2000. 59: 1387-1394.
12. Baldwin H., Johnston A., File SE. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *European Journal of Pharmacology*. 1989. 159: 211-215.
13. Bhattacharya S., Satyan K., Chakrabarti A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *Journal of Psychopharmacology* (Oxford, England). 1997. 11: 219-224.
14. Blanchard R., Blanchard D., Rodgers R., Weiss S. The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1990. 14: 491-496.
15. Brüne Martin. Textbook of evolutionary Psychiatry: The origins of psychopathology. Primera edición. Oxford University Press, New York. 2008. 408pp.
16. Calabrese E. An Assessment of Anxiolytic Drug Screening Tests: Hormetic Dose Responses Predominate. *Critical Reviews in Toxicology*. 2008. 38: 489-542.
17. Calderón de Rzedowski G. Turneraceae. En: Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. 1999. 80: 1-11.
18. Carro-Juárez M., Rodríguez-Landa J., Rodríguez-Peña M., Rovirosa-Hernández M., García-Orduña F. The aqueous crude extract of *Montanoa frutescens* produces anxiolytic-like effects similarly to diazepam in Wistar rats: Involvement of GABA_A receptor. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012. 143: 592–598.
19. Carvalho M., Moreira C., Zanolli J., Brandão M. Central, but not basolateral, amygdala involvement in the anxiolytic-like effects of midazolam in rats in the elevated plus maze. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England). 2012. 26: 543-554.

20. Cassano G., Rossi N., Pini S. Psychopharmacology of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2002. 4: 271-285.
21. Coleta M., Batista M., Campos M., Carvalho R., Cotrim M., Lima T., Cunha A. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytotherapy Research: PTR*. 2006. 20: 1067-1073.
22. Coleta M., Campos M., Cotrim M., Lima T., Cunha A. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behavioural Brain Research*. 2008. 189: 75-82.
23. Contreras C., Rodríguez-Landa J., Gutiérrez-García A., Mendoza-López M., García-Ríos R., Cueto-Escobedo J. Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. *Behavioural pharmacology*. 2011. 22: 655-662.
24. Cooper J., Bloom F., Roth R. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Octava edición, Oxford University Press. New York. 2003. 405pp.
25. Cortés-Romero C., Galindo F., Galicia-Isasmendi S., Flores A. GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revisión en Neurociencia*. 2011. 52: 665-675.
26. Craft, R.M., Howard, J.L., Pollard, G.T. Conditioned defensive burying as a model for identifying anxiolytics. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1988. 30: 775– 780.
27. Davidson J., Connor K., Zhang W. Treatment of Anxiety Disorders. En: The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology. Schatzberg A., Nemeroff C. (editores). Cuarta edición, American Psychiatric Publishing, Washington. 2009. Capítulo 56: 1616.
28. De Boer, S.F., Slangen, J.L., Van der Gugten, J. Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: effects of chlordiazepoxide. *Physiology and Behavior*. 1990. 47: 1089– 1098.

29. De Boer S., Koolhaas J. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*. 2003. 463: 145-161.
30. Degroot A., Nomikos G. Fluoxetine Disrupts the Integration of Anxiety and Aversive Memories. *Neuropsychopharmacology*. 2005. 30: 391–400.
31. Estrada Reyes R., Carro-Juárez M, Martínez-Mota L. Pro-sexual effects of *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) in male rats involves the nitric oxide pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013. 146: 164-172.
32. Estrada Reyes R., Ortiz-López P., Gutiérrez-Ortiz J., Martínez-Mota L. *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) recovers sexual behavior in sexually exhausted males. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. 123: 423-429.
33. Fernández-Guasti A., Roldán-Roldán G., Saldívar A. Reduction in anxiety after ejaculation in the rat. *Behavioural brain research*. 1989. 32: 23-29.
34. Fernandez-Guasti, A., Martinez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Contreras, C.M., Lopez-Rubalcava, C. Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1999. 63: 13–20.
35. Fernández-Guasti A., Rodríguez-Manzo G. Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scandinavian Journal of Psychology*. 2003. 44: 257-263.
36. Gama C., Narave H., Moreno P. Turneraceae. En: Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa Veracruz. 1985. 47: 1-17.
37. Gómez C., Saldívar-González J., Rodríguez R. Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*. 2002. 25: 14-24.
38. Gonzalez L., File S. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The*

- Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 1997. 17: 1505-1511.
39. Gonzalez L., Ouagazzal A., File S. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphé reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *The european journal of neuroscience.* 1998. 10: 3673-3680.
40. Hollander E., Simeon D. Anxiety disorders. En: *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychiatry.* Hales R., Yudofsky S., Gabbard G. (editores). Quinta edición, American Psychiatric Publishing. (Boulevard Arlington). 2008. Capítulo 12: 505-550.
41. Jerrold Meyer, Quenzer Linda. *Psychopharmacology: Drugs, the Brain and Behavior.* Segunda edición. Sinauer Associates Inc. 2013. 722 pp
42. Koob G., Heinrichs S., Briton K. Animal Models of Anxiety Disorders. En: *The American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology.* Schatzberg A., Nemeroff C (editores). Segunda edición. American Psychiatric Press, Inc. Washington. 1998. SIX: 133-144.
43. Kumar S., Sharma A. Anti-Anxiety Activity Studies of Various Extracts of *Turnera aphrodisiaca* Ward. *Journal of Herbal Pharmacotherapy.* 2005. 5: 13-21.
44. Kumar S., Madaan R., Sharma A. Pharmacological evaluation of Bioactive Principle of *Turnera aphrodisiaca*. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2008. 70: 740-744.
45. Lara Ochoa F. y Marquéz Alonso C. *Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividades biológicas.* Primera edición, UNAM. México. 1996. 137pp.
46. Linares Mazari E., Bye R., Flores B. *Plantas medicinales de México: Usos y remedios tradicionales.* Instituto de Biología, UNAM. México. 1999. 102pp.
47. Lydiard R. Bruce. The role of GABA in anxiety disorders. *The Journal of clinical psychiatry.* 2003. 64: 21-27

48. Lister R. Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology and Therapeutics*. 1990. 46: 321-340.
49. Lobo A., 2103. Manual de Psiquiatría General. Primera edición, Editorial Medica panamericana. Madrid. 2013. 720pp.
50. López-Rubalcava, C., Fernandez-Guasti, A., Urba-Holmgren, R. Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT_{1A} compounds. *Developmental Psychobiology*. 1996. 29: 157–169.
51. Medina-Mora, M.-E., Borges, G., Lara, C., Benjet, C., Blanco, J., Fleiz, C., Villatoro, J., Rojas, E., Zambrano, J., Casanova, L., Aguilar-Gaxiola, S. Prevalence of mental disorders and use of services: Results from the Mexican National Survey of Psychiatric Epidemiology. *Salud Mental*. 2003. 26: 1-16.
52. Möhler H., The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*. 2012. 62: 42-53.
53. Moreira C., Masson S., Carvalho M., Brandão M. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. *Brain research bulletin*. 2007. 71: 466-474.
54. Nutt D., Malizia A. New insights into the role of the GABA_A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *British Journal of Psychiatry*. 2001. 179: 390-396.
55. Nutt D., Ballenger J., Sheehan D., Wittchen H. Generalized anxiety disorder: comorbidity, comparative biology and treatment. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2002. 5: 315–325.
56. Páez-Martínez N., López-Rubalcava C., Cruz S. Avances en la investigación básica de los efectos in vivo de los disolventes de abuso. *Salud Mental*. 2003. 26: 8-16.
57. Patki G., Salvi A., Liu H., Atrooz F., Alkadhi I., Kelly M., Salim S. Tempol Treatment Reduces Anxiety-Like Behaviors Induced by Multiple Anxiogenic Drugs in Rats. 2015. 1-16.

58. Pellow S., Chopin P., File S. E., Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985. 14: 149-167.
59. Pesold C., Treit D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*. 1995. 671: 213-221.
60. Purves D., Augustine G. Fitzpatrick D., Katz L., LaMantia A-S., McNamara, J., Williams S (editors). *Neuroscience*. Second edition. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 2001. 681pp.
61. Podea D., Ratoi F. Anxiety Disorders. En: *Anxiety and Related Disorders*. Szirmai A. (editor). Editorial InTech, 2011. Capítulo 1: 3-34.
62. Ratner S. Comparative aspects of hypnosis. En: *Handbook of Clinical and Experimental Hypnosis*. Gordon J. (editor). Macmillan. New York. 1967. 17: 550-587.
63. Rättsch C. Las plantas del amor, Los afrodisiacos en los mitos, la historia y el presente. Primera edición. Fondo de Cultura Económica. México. 2011. 207pp.
64. Rejón-Orantes J., Placer D., Roldán G. Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas Médica*. 2011. 52: 78-89.
65. Rogel-Salazar G., Lopez-Rubalcava C. Evaluation of the anxiolytic-like effects of clomipramine in two rat strains with different anxiety vulnerability (Wistar and Wistar-Kyoto rats): participation of 5-HT_{1A} receptors. *Behavioural Pharmacology*. 2011. 22: 136-146.
66. Rodríguez-Landa J., García-Ríos R., Cueto-Escobedo J., Bernal-Morales B., Contreras C. Participation of GABAA Chloride Channels in the Anxiolytic-Like Effects of a Fatty Acid Mixture. *BioMed Research International*. 2013. 2013: 1-7.

67. Rodríguez-Manzo G., López-Rubalcava C., Fernández-Guasti A. Anxiolytic-Like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiology & behavior*. 1999. 67: 651-657.
68. Rodgers R., Cao B., Dalvi A., Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997. 30: 289-304.
69. Rogawski M., Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004. 5: 553-564.
70. Sandford J., Argyropoulos S., Nutt D. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000. 88: 97-212.
71. Schultes R., Hoffman A., Ralsch C. Plantas de los dioses, Las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas. Segunda edición, Fondo de Cultura Económica. México. 2000. 208pp.
72. Sigel E., Steinmann E. Structure, Function and Modulation of GABA_A receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. 287: 40224-40231.
73. Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2011. 13: 495-506.
74. Szewczyc K., Zidorn C., Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana-*Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014.152: 424-443.
75. Taha M., Salga M., Ali H., Abdulla M., Abdelwahab S., Hadi A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012.141: 273-281.
76. Treit D., Pinel J., Fibiger H. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1981. 15: 619-626.

77. Treit D., Pinel J., Fibiger H. The Inhibitory Effect of Diazepam on Conditioned Defensive Burying is reversed by picrotoxin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1982. 17: 359-361.
78. Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1985. 9: 203-222.
79. Treit, D. A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1990. 36: 203– 205.
80. Treit D., Menard J., Royan C., Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993. 44: 463-469.
81. Treit D., Pesold C., Rotzinger S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behavioral neuroscience*. 1993.107: 770-785.
82. Treit D., Engin E., McEown K. Animal Models of Anxiety and Anxiolytic Drug Action. *Current topics in behavioral neurosciences*. 2010. 2: 121-160.
83. Viola H., Wasowski C., Levi de Stein M., Wolfman C., Silveira R., Dajas F., Medina J., Paladini A. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica*. 1995. 61: 213–216.
84. Walf A., Frye C. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2005. 30: 1288-1301.
85. Yadin E., Thomas E., Grishkat H., Strickland C. The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiology & Behavior*. 1993. 53: 1077-1083.
86. Zanolli P., Avallone R., Baraldi M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia*. 2000. 71: S117-S123.
87. Zhao J., Pawar R., Ali Z., Khan I. Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of Natural Products*. 2007. 70: 289-292.

88. Zhao J., Dasmahapatra A., Khan S., Khan I. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2008. 120: 387-393.
89. Flint AJ. Epidemiology and comorbidity of anxiety disorders in later life: implications for treatment. *Clinical neuroscience (New York, N.Y.)* 1997. 4: 31-36.