



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOMEDICINA

**Evaluación del efecto modulador producido por la  
mezcla G-1-F-2 sobre sinapsis estriatales.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Daniel Alonso Villarreal**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ  
ECHEAGARAY**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**DRA. MIREYA ALCARAZ ZUBELDIA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOMEDICINA

**Evaluación del efecto modulador producido por la  
mezcla G-1-F-2 sobre sinapsis estriatales.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Daniel Alonso Villarreal**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ  
ECHEAGARAY**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**DRA. MIREYA ALCARAZ ZUBELDIA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/179/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biomedicina)** del estudiante **ALONSO VILLARREAL DANIEL**, con número de cuenta **106001338** con la tesis titulada **“Evaluación del efecto modulador producido por la mezcla G-1-F-2 sobre sinapsis estriatales.”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ÁNGULO  
Vocal: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES  
Vocal: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ  
Vocal: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ  
Secretario: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de febrero de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX. Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

## Agradecimientos institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de continuar aprendiendo sobre la Biología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me fue brindado a través de la beca con número 760911 y sin la cual, no habría podido realizar mis estudios de posgrado.

A la UNAM por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de este trabajo, por medio de una beca del programa DGAPA-PAPIIT, a través del proyecto IN216721.

A mi directora de Tesis la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, así como a mi comité tutor, conformado por la Dra. Mireya Alcaraz Zubeldia y el Dr. José Guillermo Ávila Acevedo, gracias por sus consejos, sus comentarios, su comprensión y ayuda durante los momentos más complicados en el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos personales.

A la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, de quien he aprendido que lo más importante en este mundo científico es no perder la humanidad, gracias por todo su apoyo, su comprensión, las innumerables pláticas, consejos y lecciones que con cariño me proporciono, pero, sobre todo, gracias por su amistad.

Al Dr. Paquito, la Dra. Liz, Vic, Angie y Edgar quienes no solo son mis compañeros de laboratorio, sino también una segunda familia, gracias por su apoyo, sus consejos y su amistad.

Al técnico académico M. en C. Ernesto Mendoza Duarte, gracias por todo su apoyo durante el desarrollo de este trabajo, en donde su ayuda, sus consejos y su amistad fueron realmente invaluable, QEPD.

Al Dr. Alfredo Ortega Hernández quien se encuentra adscrito al instituto de Química de la UNAM, ya que proporciono la mezcla denominada G-1-F-2 y que sin la cual, este trabajo no hubiera sido realizado.

A los miembros del comité sinodal, ya que sus comentarios y observación enriquecieron mi trabajo.

## Dedicatorias

A mi madre, quien, aunque este año ya no está conmigo sin su amor infinito, su esfuerzo y su apoyo incondicional, no sería la persona que soy hoy, siempre te amaré y sea donde sea que te encuentres quiero que sepas que siempre estaré orgulloso de ser tu hijo. Gracias por todo mi viejita.

A mi padre, quien me ha apoyado incondicionalmente, gracias por todo tu esfuerzo y dedicación al cuidarnos, tú eres uno de mis mayores ejemplos a seguir.

A mis hermanas Darla y Kari, quienes siempre han estado y siempre estarán conmigo, gracias por su apoyo, sus consejos y todo su amor, ustedes siempre serán una de mis mayores e inagotables fuentes de inspiración.

A Ceci, quien es el amor de mi vida, gracias por estar conmigo en mis momentos más oscuros y llenarlos de luz, alegría, pero sobre todo de amor. Te amo infinitamente.

Tanto a mis viejos amigos Angie, John, Ely, Ray, Vale y José; como a los nuevos Den, Karen y Walter, gracias por todos los grandes momentos que me han regalado a lo largo de nuestra amistad.

“Ama lo que haces y haz lo que amas. No escuches a nadie más que te diga que no lo hagas. Haz lo que quieras, lo que ames. La imaginación debe ser el centro de tu vida”.

- Ray Bradbury

“Es igual que en los grandes cuentos, mi señor Frodo, los cuentos que eran importantes, estaban llenos de oscuridad y peligro, a veces, uno no quería saber el fin, porque, ¿cómo podría ser un final feliz?, ¿cómo podría el mundo ser como antes cuando han pasado tantas cosas malas?

Pero al final, las sombras sólo son, transitorias, aún la oscuridad debe terminar; vendrá un nuevo día, cuando el sol brille iluminará hasta la claridad.

Esos eran los cuentos que permanecían, que tenían significado, aunque fuera demasiado pequeño para entender por qué.

Pero mi señor Frodo, creo que, si lo entiendo, ahora lo sé, porque la gente en ellos tuvo ocasión de dar la vuelta y nunca lo hizo, siguió caminando, porque tenía algo de lo cual aferrarse.”

-Samsagaz Gamyi.- El señor de los anillos: Las dos torres.

## ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract .....	2
1.- Introducción.....	3
1.1- Sistema nervioso .....	3
1.2- Ganglios basales .....	4
1.3- Núcleo estriado.....	8
2.- Antecedentes .....	9
2.1- Plantas medicinales con efecto depresor sobre el sistema nervioso .....	9
2.2- <i>Galphimia glauca</i> Cav.....	10
2.3- Galphimine-B .....	13
2.4- Galphimine-A .....	14
3.- Planteamiento del problema.....	16
4.- Hipótesis .....	17
5.- Objetivos .....	17
6.- Consideraciones metodológicas .....	18
6.1- Registro electrofisiológico de potenciales de campo .....	18
6.2- Protocolo de pulso pareado .....	19
7.- Materiales y Métodos .....	21
7.1- Animales .....	21
7.2- Fármacos.....	21
7.3- Preparación de tejido .....	22
7.4- Registro electrofisiológico .....	22
7.5-Análisis de resultados .....	23
8.- Resultados .....	25

8.1.- Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre la respuesta sináptica poblacional estriatal, en presencia de Diazepam.....	27
8.2.- Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre la respuesta sináptica poblacional estriatal, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA.....	32
9.- Discusión.....	37
10.- Conclusiones.....	42
11.- Anexo uno.....	43
12.- Anexo dos.....	47
13.- Referencias bibliográficas.....	54

## Tabla de Figuras

Figura 1. Modelo de los ganglios basales .....	5
Figura 2. Esquema de las vías directa e indirecta de los ganglios basales.....	7
Figura 3. <i>Galphimia glauca</i> Cav .....	11
Figura 4. Estructura química de Galphimine-B y Galphimine-A. ....	13
Figura 5. Representación de un potencial de campo. ....	19
Figura 6. Facilitación y depresión por pulso pareado.....	20
Figura 7. Esquema representativo del método electrofisiológico de estimulación y registro. ....	23
Figura 8. Curva intensidad-amplitud.....	26
Figura 9. Control largo.....	27
Figura 10. Curva concentración-respuesta.....	28
Figura 12. Relación de pulso pareado (PPR) antes y después de la aplicación de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Diazepam. ....	31
Figura 13. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA.....	34
Figura 14. Relación de pulso pareado (PPR) antes y después de la aplicación de Memantina y la mezcla G-1-F-2. ....	35
Figura 15. Relación de pulso pareado (PPR) antes y después de la suspensión de Memantina.....	36
Figura 16. Esquema del posible efecto de G-1-F-2 sobre los receptores GABA <sub>A</sub> y NMDA.....	41
Figura suplementaria 1. Efecto de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Bicuculina. ....	43
Figura suplementaria 2. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA. ....	44

Figura suplementaria 3. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA. .....	45
Figura suplementaria 4. Relación de pulso pareado (PPR) antes y después de la aplicación de G-1-F-2.....	46

## ABREVIATURAS

ATV: Área tegmental ventral	RSPE: Respuesta sináptica poblacional evocada
DMSO: Dimetil-sulfóxido	RSPE1: Respuesta sináptica poblacional evocada ante el primer estímulo
E1: Primer estímulo	S1: Respuesta sináptica uno
E2: Segundo estímulo	S2: Respuesta sináptica dos
Fig.: Figura	SN: Sustancia nigra
G-1-F-2: Mezcla constituida por Galphimine-B y Galphimine-A	SNC: Sistema nervioso central
G-A: Galphimine-A	SNC: Sustancia nigra pars compacta
GABA: Ácido $\gamma$ -aminobutírico	SNP: Sistema nervioso periférico
G-B: Galphimine-B	SNr: Sustancia nigra pars reticulata
GP: Globo pálido	
GPe: Globo pálido externo	
GPI: Globo pálido interno	
msnm: metros sobre el nivel del mar	
MSNs: Neuronas espinosas medianas	
NE: Núcleo estriado	
NMDA: N-metil-D-aspartato	
NST: Núcleo subtalámico	
PPD: Depresión por pulso pareado	
PPF: Facilitación por pulso pareado	
PPR: Relación de pulso pareado	
RSP: Respuesta sináptica poblacional	

## Resumen

*Galphimia glauca* es una especie vegetal nativa de México a la que popularmente se le conoce como “calderona amarilla”, la cual en la medicina tradicional mexicana se utiliza principalmente como un sedante o tranquilizante, debido a sus propiedades psicotrópicas. Se sabe que, los principios activos de esta especie vegetal son una serie de moléculas a las que se les ha denominado como “Galphimines”; siendo Galphimine-B (G-B) y Galphimine-A (G-A), a las que se les considera como las principales responsables de los efectos depresores sobre el sistema nervioso; esto, debido a que se ha demostrado que G-B induce un efecto inhibitor sobre la frecuencia de disparo de neuronas del área tegmental ventral e hipocampo; mientras que, G-A inhibe de manera dosis-dependiente la respuesta neuronal de la amígdala basolateral, de igual forma, se ha demostrado la alta similitud entre el efecto sistémico inducido por estas dos moléculas y el efecto sistémico inducido por un ansiolítico estándar. Y aunque no existe literatura que esclarezca tanto el mecanismo de acción como los circuitos neuronales involucrados en el efecto depresor inducido por G-B y G-A, diversos autores han propuesto que el mecanismo de acción de estas moléculas se encuentra asociado con sistemas de neurotransmisión GABAérgicos; sin embargo, al evaluar el efecto inducido por una mezcla conformada por G-B y G-A (mezcla G-1-F-2) sobre la actividad sináptica estriatal, se evidencio que el efecto inducido por esta mezcla parece no estar relacionado con sistemas GABAérgicos.

Por consiguiente y debido a que la mezcla G-1-F-2 incrementa la amplitud de la espiga sináptica poblacional estriatal y dado que esta respuesta posee un componente glutamatérgico y uno GABAérgico, en este trabajo, se llevó a cabo por medio del registro electrofisiológico de potenciales de campo, la evaluación del efecto modulador inducido por la mezcla G-1-F-2 sobre la actividad sináptica poblacional estriatal en presencia de un modulador alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A</sub> (Diazepam), así como de un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, llamado Memantina.

Los resultados demuestran que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2, conformada por Galphimine-B y Galphimine-A, no actúa sobre sistemas de neurotransmisión GABAérgicos, particularmente sobre receptores GABA<sub>A</sub>; sino que más bien, el efecto inducido por estas moléculas actúa sobre sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos.

## Abstract

*Galphimia glauca* is a plant species native to Mexico commonly known as “calderona amarilla”, it has been mainly used in Mexican traditional medicinal as a sedative or tranquilizer, due to its psychotropic properties. It is known that the active principles of this species are a series of molecules that have been called "Galphimines"; particularly Galphimine-B (G-B) and Galphimine-A (G-A) are considered the main responsible for the depressive effects on the nervous system; this is due G-B has been shown to induce an inhibitor effect on the firing rate frequency of neurons in the ventral tegmental area and hippocampus, whilst, G-A dose-dependent inhibits the neuronal response of basolateral amygdala; in the same way, it has been demonstrated a high similarity between the systemic effect induced by these two molecules and the systemic effect induced by a standard anxiolytic agent. And although there is no literature that clarifies both the mechanism of action and the neural circuits involved in the depressor effect induced by G-B and G-A; several authors have proposed that the mechanism of action of these molecules is associated with GABAergic neurotransmission systems. However, the evaluation of the effect induced by a mixture conformed by G-B and G-A (mixture G-1-F-2) on striatal synaptic activity, showed that the effect induced by this mixture, does not appear to be related to GABAergic systems.

Therefore, and because the G-1-F-2 mixture increases the amplitude of the striatal population synaptic spike and given that this response has a glutamatergic and a GABAergic component. This work evaluates, by means of electrophysiological recording of field potentials, the modulatory effect induced by the G-1-F-2 mixture on the striatal synaptic activity, in the presence of a positive allosteric modulator of GABAA receptors (Diazepam), as well as, of a non-competitive antagonist of NMDA receptors, called Memantine.

The results show that the effect induced by the G-1-F-2 mixture, conformed of Galphimine-B and Galphimine-A, does not act on GABAergic neurotransmission systems, particularly on GABA<sub>A</sub> receptors; rather, the effect induced by these molecules acts on glutamatergic neurotransmission systems.

# 1.- Introducción

## 1.1- Sistema nervioso

La mayoría de los organismos del reino animal poseen la capacidad de percibir, procesar e interpretar diversos estímulos, tanto internos como externos, ejerciendo una o múltiples respuestas según las necesidades propias del organismo. En grupos como los cnidarios, platelmintos, moluscos, artrópodos y cordados se ha desarrollado una compleja red de estructuras anatómicas, a la que se le ha denominado sistema nervioso, la cual tiene por tarea controlar y regular el correcto funcionamiento del organismo, así como sus diversos procesos de comunicación (Holland, 2015; Sousa *et al.*, 2017).

En cordados particularmente en humanos, el sistema nervioso se puede definir como un conjunto de elementos anatómicos que reciben, procesan, integran y correlacionan distintos tipos de información, con la finalidad de coordinar y regular las respuestas tanto internas como externas del organismo. Anatómicamente el Sistema Nervioso se ha clasificado en el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y mientras que el SNC se encuentra conformado por el encéfalo (cerebro, cerebelo y tracto encefálico) y la medula espinal, el SNP se encuentra constituido por nervios craneales y raquídeos, ganglios nerviosos, ganglios simpáticos, parasimpáticos y entéricos (Langley *et al.*, 1981; Waxman, 2011; Quiroz, 2012).

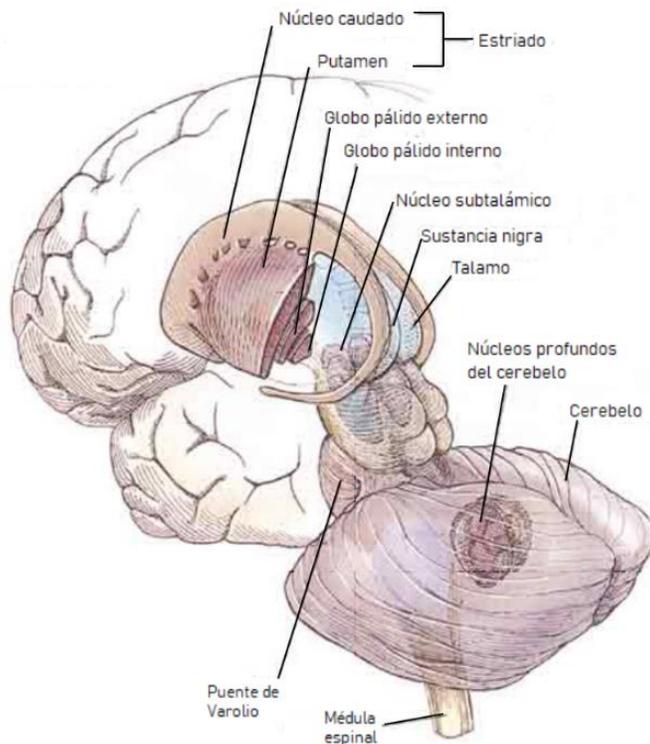
Ahora bien, se considera a las neuronas como la unidad básica fundamental del sistema nervioso ya que estas células altamente especializadas tienen la propiedad de generar, codificar y propagar información a manera de señales químicas y/o eléctricas, de forma que se pueden identificar tres tipos básicos de neuronas: las neuronas aferentes o sensitivas, las cuales conducen la información desde la periferia hacia el cerebro y/o cordón nervioso; las neuronas eferentes o motoras que conducen la información desde el cerebro hacia la periferia y por último se encuentra un tipo de células nerviosas que funcionan como un puente de comunicación entre las neuronas aferentes y eferentes a las que se les conoce como interneuronas; de modo que al conjunto de conexiones sinápticas estructuradas que se producen

como resultado de la unión de diferentes neuronas, se denomina “circuito neuronal” (Langley *et al.*, 1981; Afifi & Bergman, 2006; Waxman, 2011; Purves *et al.*, 2015); por su parte a los circuitos neuronales que codifican, procesan y propagan el mismo tipo de información se les considera como sistemas neuronales, siendo los ganglios basales un claro ejemplo de estos sistemas, ya que estos son una red de estructuras altamente organizadas e interconectadas entre sí, que intervienen en procesos motores, sensitivos y cognitivos (Snell, 2006; Purves *et al.*, 2015).

## **1.2- Ganglios basales**

Los ganglios basales también llamados núcleos basales son un conjunto de estructuras subcorticales estrechamente conectadas entre sí, que se localizan topográficamente en la parte ventral de los hemisferios cerebrales, extendiéndose desde la base del telencéfalo a través de la porción central del diencefalo hasta el tegmento del mesencéfalo (Hauber, 1998; Yin & Knowlton, 2006; Nieuwenhuys *et al.*, 2009); de forma que este grupo de estructuras subcorticales directamente relacionadas con la corteza cerebral, el cerebelo y el tálamo, constituyen un sistema integral que garantiza la intervención, organización y ejecución de programas motores, así como también juegan un papel fundamental tanto en la actividad cognitiva como en procesos de memoria, aprendizaje y de asociación (Smith *et al.*, 1998; Alvares-González *et al.*, 2001; Gerfen & Surmeier, 2011; Herrero *et al.*, 2012; Ospina-García *et al.*, 2017).

Anatómicamente los ganglios basales se encuentran conformados por cuatro núcleos subcorticales que son: el núcleo estriado, el globo pálido, la sustancia nigra y el núcleo subtalámico (Fig.1) (Parent & Hazrati, 1995; Tepper & Plenz, 2006; Bolam *et al.*, 2009).



**Figura 1. Modelo de los ganglios basales.** Modelo esquemático de la anatomía de los ganglios basales de un cerebro humano (figura tomada y modificada de Balari & Lorenzo, 2009).

Particularmente en primates humanos y no humanos, la división dorsal de los ganglios basales consiste en el núcleo estriado (NE), el cual es dividido por la cápsula interna en caudado y putamen, el globo pálido (GP) tanto en su segmento interno (GPi) como en su segmento externo (GPe), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra (SN), esta última, a su vez dividida en dos porciones: la sustancia nigra pars compacta (SNc) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr), por otra parte la región ventral de los ganglios basales, se encuentra constituida por el estriado ventral o núcleo accumbens, el pálido ventral (equivalente al globo pálido externo e interno) y el área tegmental ventral (ATV) y mientras que estas estructuras se asocian con funciones límbicas; la región dorsal de los ganglios basales se asocia principalmente con funciones motoras y cognitivas (Hauber, 1998; Bolam *et al.*, 2000; Tisch *et al.*, 2004; Tepper & Plenz, 2006; Obeso *et al.*, 2008; Bolam *et al.*, 2009).

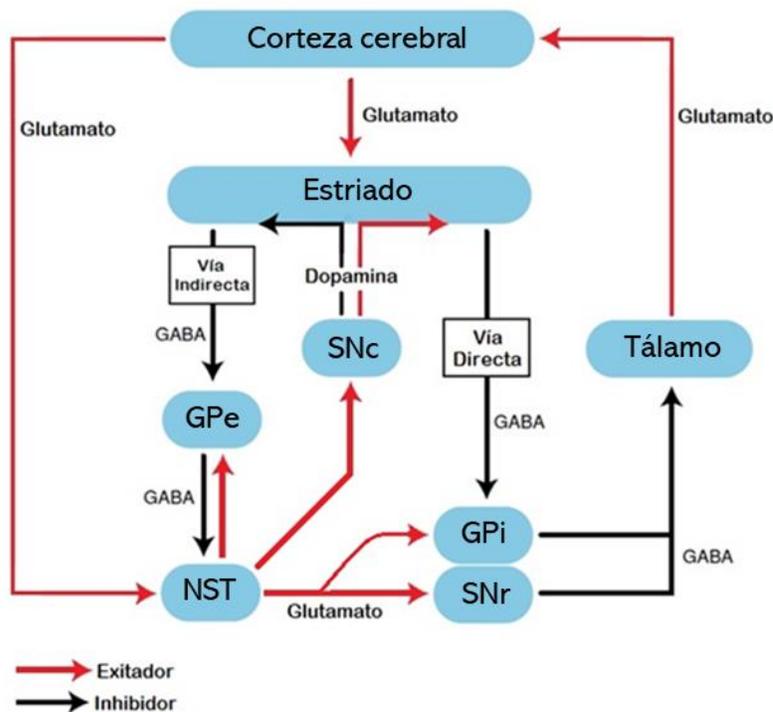
Ahora bien, se sabe que en su mayoría estas estructuras se encuentran conformadas principalmente por neuronas de naturaleza GABAérgica, es decir,

neuronas que utilizan el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, tal es el caso de las neuronas de proyección tanto del estriado como de ambos segmentos del GP y de la SNr; sin embargo existen algunas excepciones, como lo son las neuronas glutamatérgicas del NST, las neuronas dopaminérgicas de la SNc, así como las poblaciones de interneuronas acetilcolinérgicas del estriado (Bolam *et al.*, 2000; Tepper & Plenz, 2006; Bolam *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2013).

No obstante, en su mayoría las aferencias que reciben los ganglios basales son aferencias excitatorias de naturaleza glutamatérgica proyectadas desde la corteza cerebral y el tálamo, de tal forma que el núcleo estriado se considera como la principal entrada de información hacia los ganglios basales, ya que las neuronas de proyección estriatales que reciben las proyecciones corticales y talámicas establecen comunicación sináptica con el GP, la SN y el NST, los cuales a su vez proyectan la información hacia la corteza por medio del tálamo; es decir, los ganglios basales procesan, integran y transmiten la información que proviene tanto de la corteza cerebral como del tálamo, por medio de conexiones topográficamente organizadas en dos sistemas de proyección paralelos y complementarios a los que se les ha denominado como “vía directa” y “vía indirecta” (Fig.2) (Afifi & Bergman, 2006; Bolam *et al.*, 2009; Gerfen & Surmeier, 2011; Yamada *et al.*, 2016).

Por una parte la vía directa (Fig.2) es un circuito que se origina a partir de neuronas espinosas medianas (MSNs por sus siglas en inglés) de proyección estriatonigrales, las cuales reciben aferencias glutamatérgicas proyectadas desde la corteza y el tálamo; de manera que las MSNs establecen conexiones sinápticas de naturaleza GABAérgica con el GPi y con la SNr, los que a su vez, proyectan conexiones axónicas inhibitorias hacia el núcleo motor del tálamo posibilitando la activación de los circuitos premotores corticales, es decir, como resultado de la activación de la vía directa se genera la desinhibición de las proyecciones excitatorias tálamo-corticales que proyectan hacia los circuitos premotores corticales, lo que se traduce en la selección y/o facilitación del movimiento voluntario (Lewis *et al.*, 2003; Kreitzer & Malenka, 2008; Obeso *et al.*, 2008; Purves *et al.*, 2015). Por el contrario, el circuito de la vía indirecta (Fig.2) se origina a partir de MSNs estriatopalidales que forman

sinapsis inhibitorias con neuronas GABAérgicas del GPe, el cual proyecta con neuronas glutamatérgicas del NST, el que a su vez establece conexiones sinápticas excitatorias con la SNr y el GPi, en donde se generan sinapsis excitatorias sobre las neuronas inhibitorias que proyectan estos núcleos hacia el tálamo; de forma que la activación de la vía indirecta genera la inhibición de neuronas de proyección tálamo-corticales, reduciendo así la estimulación cortical premotora lo que resulta en la supresión del movimiento (Lewis *et al.*, 2003; Kreitzer & Malenka, 2008; Obeso *et al.*, 2008; Purves *et al.*, 2015). En resumen, se puede decir que la vía indirecta es antagónica y complementaria a la vía directa, ya que en conjunto estos circuitos actúan como un interruptor que permite la apertura o el cierre de las puertas fisiológicas que inician y terminan el movimiento (Purves *et al.*, 2015).



**Figura 2. Esquema de las vías directa e indirecta de los ganglios basales.** Dónde: GPe= Globo pálido externo, GPi= Globo pálido interno, NST= Núcleo subtalámico, SNr= Sustancia nigra pars reticulata, SNc= Sustancia nigra pars compacta; en rojo se muestran las proyecciones excitatorias, mientras que en negro se muestran las proyecciones inhibitorias. (Figura tomada y modificada de Lewis *et al.*, 2003).

### 1.3- Núcleo estriado

El núcleo estriado es la estructura subcortical más grande de los ganglios basales y se considera como la principal entrada de información hacia estos, debido a que esta estructura recibe, procesa e integra la información proyectada desde la corteza cerebral y el tálamo, induciendo la formación de programas motores por medio de circuitos neuronales locales, los cuales son los responsables de promover tanto la facilitación como la inhibición del movimiento, así como de procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje (Snell, 2006; Crittenden & Graybiel, 2011; Do *et al.*, 2013).

Se sabe que aproximadamente el 95% de la población neuronal estriatal se encuentra constituida por neuronas de proyección de naturaleza GABAérgica llamadas, neuronas espinosas medianas (MSNs), las cuales son neuronas que se caracterizan por su alta densidad de espinas dendríticas, un potencial de reposo negativo y bajas tasas de activación *in vivo* (Parent & Hazrati, 1995; Kreitzer & Malenka, 2008; Bolam *et al.*, 2009), es decir, presentan pocos potenciales de acción espontáneos y solo son activadas si reciben algún estímulo de la corteza y/o el tálamo (Kawaguchi, 1997; Gerfen & Surmeier, 2011).

Ahora bien las neuronas espinosas medianas se han categorizado en dos subpoblaciones, con base en su región de proyección axonal y su neuroquímica, de modo que una subpoblación da origen a la vía directa y otra subpoblación a la vía indirecta; particularmente las MSNs estriatonigrales que proyectan y establecen conexión sináptica con el GPi y la SNr (vía directa) exhiben una alta concentración de receptores dopaminérgicos D1 y muscarínicos M4, así como además de GABA, co-expresan neuropéptidos como la sustancia-P y dinorfina; por el contrario, las MSNs estriatopalidales que proyectan y establecen conexión sináptica con el GPe, NST y GPi (vía indirecta) exhiben una alta expresión de receptores dopaminérgicos D2 y adenosina A2, así como además de GABA, co-expresan encefalina (Parent & Hazrati, 1995; Hauber, 1998; Kreitzer & Malenka, 2008; Obeso *et al.*, 2008; Lanciego *et al.*, 2012; Do *et al.*, 2013).

Por su parte, el 5% restante de la población neuronal estriatal se encuentra conformado por neuronas de circuito local, llamadas interneuronas, las cuales se clasifican según sus propiedades neuroquímicas, morfológicas y fisiológicas (Hauber, 1998; Afifi & Bergman, 2006; Bolam *et al.*, 2009; Lanciego *et al.*, 2012), de modo que en el estriado se pueden identificar al menos tres poblaciones de interneuronas GABAérgicas y una población de interneuronas colinérgicas, siendo esta última la población más abundante en el núcleo estriado, mientras que las interneuronas GABAérgicas se dividen en dos clases: 1) fast-spiking que son positivas histológicamente a parvalbúmina y 2) low-threshold spiking las cuales expresan somatostatina, óxido nítrico sintasa, neuropéptido-Y, así como calretinina (Parent & Hazrati, 1995; Kawaguchi, 1997; Tepper & Plenz, 2006; Kreitzer & Malenka, 2008; Bolam *et al.*, 2009; Lanciego *et al.*, 2012).

De tal forma, se puede decir que las conexiones sinápticas que establecen las interneuronas forman circuitos locales, los cuales, a su vez modulan la actividad de las MSNs de proyección (Kawaguchi, 1997; Tepper & Plenz, 2006).

## **2.- Antecedentes**

### **2.1- Plantas medicinales con efecto depresor sobre el sistema nervioso**

México es catalogado como un país megadiverso, debido a la gran cantidad de especies, tanto animales como vegetales, registradas en él (Challenger & Soberón, 2008; Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010; CONABIO, 2020), también se caracteriza por una gran riqueza cultural la cual se encuentra diversificada en alrededor de 68 grupos étnicos distribuidos en 494 municipios del país (INEGI, 2016; Mamo, 2022; SIC México, 2022).

Estos grupos étnicos poseen información empírica sobre el uso, aplicación y consumo de diversas especies vegetales para el tratamiento de diversos malestares “populares” como fiebre, tos, gripe, dolor estomacal, dolor articular, cólicos, ansiedad, nerviosísimo, insomnio, etc. (Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010;

Gómez-Álvarez, 2012; Pérez & González, 2015). Se ha estimado que, de las aproximadamente treinta mil especies vegetales registradas en el país, entre cuatro y cinco mil son las utilizadas por estos grupos en el tratamiento de dichos malestares, sin embargo, tanto la evaluación como la validación química, farmacológica y biomédica solo se ha realizado en aproximadamente el 5% de estas especies vegetales (Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010; Guzmán *et al.*, 2014; Ávila-Uribe, 2016).

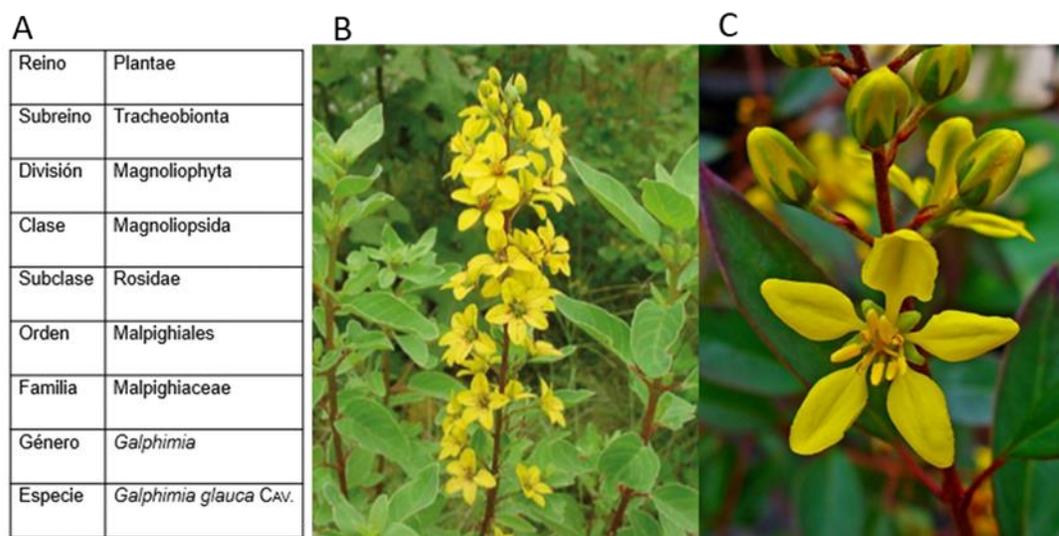
Por tanto, el estudio de especies vegetales como: *Agastachle mexicana* (Toronjil morado), *Cinnamomum* sp. (Canela), *Chiranthodendron pentadactylon* (Flor de manita), *Foeniculum vulgare* (Hinojo), *Ipomoea stans* (Tumba vaquero), *Galphimia glauca* (Calderona amarilla), *Passiflora suberosa* (Pasiflora), *Pasiflora caerulea* (Pasiflora), *Humulus lupulus* (Lúpulo), *Panax ginseng* (Ginseng), *Tilia europea* (Tila), *Valeriana officinalis* (Valeriana), *Brugmansia candida* (Florifundio o Floripondio), *Helianthus annuus* (Girasol), *Heteropterys beecheyana* (Bejuco), las cuales son utilizadas por estos grupos étnicos en el tratamiento de trastornos neurológicos como epilepsia, demencia, ansiedad, nerviosismo e insomnio (Guzmán *et al.*, 2014; Pérez & González, 2015; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana<sup>A</sup>, 2022), proporcionaría información sobre los principios activos que sintetizan estas plantas, así como sus potenciales efectos ansiolíticos, antidepresivos y sedantes sobre el sistema nervioso (Ortiz-Caltempa, 2008).

## **2.2- *Galphimia glauca* Cav.**

*Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae), es una especie vegetal nativa de México, a la que popularmente se le conoce como: calderona amarilla, calderón amarillo, hierva del piojo, flor estrella, flor de diciembre, ramo de oro y árnica roja (León, 2018; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana<sup>B</sup>, 2022). Este arbusto de uno a cuatro metros de altura, altamente ramificado, presenta abundantes y dispersas inflorescencias de color amarillo con forma de estrella, las cuales se hallan dispuestas en racimos densos (Fig.3); su crecimiento se encuentra asociado a perturbaciones vegetales en pastizales, matorrales y bosques, exhibe una distribución en climas semicálidos y templados en altitudes que van de los 920 a los

2600 msnm (metros sobre el nivel del mar), de modo que en México se distribuye principalmente en los estados de Guerrero, Michoacán, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas, Sonora y Tamaulipas (Avilés-Montes, 2015; León, 2018; Sharma *et al.*, 2018; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana<sup>B</sup>, 2022).

En la medicina tradicional mexicana se tienen registros del uso de la infusión de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *G. glauca* como un sedante o tranquilizante principalmente en el tratamiento del estrés, miedo, nerviosismo, ansiedad e insomnio (Tortoriello *et al.*, 2006; González-Cortazar *et al.*, 2014; Avilés-Montes *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2018); por lo que en los últimos años se han realizado diversos estudios, los cuales tenían por objetivo el dilucidar los diferentes efectos depresores producidos por esta especie vegetal sobre el sistema nervioso central.



**Figura 3.** *Galphimia glauca* Cav. A clasificación botánica de *G. glauca*; B disposición de las inflorescencias, tallos y hojas de esta especie vegetal y C inflorescencia (Imágenes B y C tomadas de Tortoriello *et al.*, 2011; Zell, 2009, respectivamente).

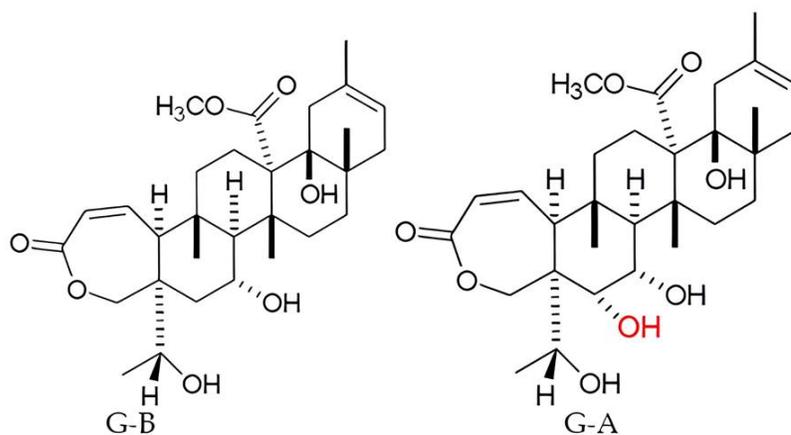
Resultados obtenidos por medio de la evaluación del efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *G. glauca*, en modelos neurofarmacológicos (reflejo peristáltico, efecto hipotónico, convulsiones inducidas) evidenciaron que dicho extracto inhibe el 95% de las contracciones peristálticas de íleon de cobayo,

disminuye en al menos un 30% las contracciones inducidas con estriquina y ejerce un efecto potencializador dosis-dependiente de hasta un 76% sobre el efecto hipotónico inducido por el pentobarbital sódico; estos resultados sugieren la existencia de componentes activos en *G. glauca*, los cuales ejercen un efecto depresor sobre el sistema nervioso central (Tortoriello, 1991; Tortoriello & Lozoya, 1992). Asimismo, con la finalidad de evaluar la actividad antidepresiva del extracto metanólico estandarizado de *G. glauca* Herrera-Ruiz y cols., en el año 2006, por medio de pruebas conductuales (laberinto elevado, luz-obscuridad y nado forzado) realizadas a ratones, demostraron diferencias significativas entre el comportamiento de los ratones tratados con el extracto de *G. glauca* y aquellos que fueron tratados con un ansiolítico estándar (Diazepam), de igual forma se exhibió la alta similitud entre el efecto depresor ejercido por el extracto estandarizado y el efecto ansiolítico producido por el Diazepam; por lo que concluyeron que el extracto estandarizado de *G. glauca* ejerce un efecto ansiolítico sobre el sistema nervioso central.

Por otra parte, en el año 2007 Aguilar-Santamarina y cols., llevaron a cabo la evaluación toxicológica y citotóxica de diversos extractos (acuoso, metanólico y etanólico) de *G. glauca*, administrados subcrónicamente en altas dosis a ratones, así como en diferentes líneas celulares evaluando los efectos fármaco-toxicológicos *in vivo* e *in vitro* producidos por dichos extractos; los resultados de los análisis histopatológicos de hígado, páncreas, corazón, riñón, pulmón, estómago y cerebro no revelaron ninguna alteración bioquímica e histológica, similarmente los resultados obtenidos mediante la evaluación citotóxica *in vitro*, no mostraron ningún tipo de efecto apoptótico o necrótico, por lo que concluyeron que los extractos de *G. glauca* no presentan ningún efecto toxicológico, genotóxico o citotóxico. En contraste, pruebas clínicas han evidenciado la seguridad y efectividad terapéutica del uso del extracto metanólico de *G. glauca* como un tratamiento opcional en pacientes diagnosticados con ansiedad generalizada (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006; Herrera-Arellano *et al.*, 2007; Herrera-Arellano *et al.*, 2012).

Ahora bien, por medio de estudios fitoquímicos y conformacionales realizados al extracto metanólico de *G. glauca*, se obtuvo la identificación de los principios activos

de esta especie vegetal, los cuales son una serie de triterpenos, moléculas conformadas por 30 carbonos dispuestos en cuatro anillos con seis carbonos cada uno y un quinto anillo heterocíclico, a los que se les nombro “Galphimines” (Toscano *et al.*, 1993; Cardoso-Takeda *et al.*, 2008; González-Cortazar *et al.*, 2014). Similarmente mediante el estudio químico bio-dirigido del extracto metanólico de *G. glauca*, se logró la aislación e identificación de varias Galphimines, las cuales poseen una alta similitud estructural, siendo Galphimine-B y Galphimine-A (Fig.4) las moléculas a las que se les consideró como las principales responsables de los efectos depresores sobre el sistema nervioso central, debido a sus propiedades psicotrópicas (Tortoriello & Ortega, 1993; Cardoso-Takeda *et al.*, 2004; Lara-Ochoa *et al.*, 2005).



**Figura 4. Estructura química de Galphimine-B y Galphimine-A.** Se observa la alta similitud estructural entre G-B y G-A, con la única diferencia (marcada en rojo), que radica en G-A con un grupo hidroxilo en el carbono número seis, mientras que G-B no presenta ningún sustituyente (Figura

modificada de Tortoriello *et al.*, 2011).

### 2.3- Galphimine-B

Como se mencionó anteriormente, Galphimine-B (G-B) se considera como uno de los triterpenos responsable de los efectos depresores de *G. glauca* sobre el sistema nervioso central, puesto que resultados obtenidos mediante la separación, identificación y evaluación de Galphimine-B en modelos neurofarmacológicos (reflejo peristáltico, efecto hipotónico y convulsiones inducidas), evidenciaron que este triterpeno inhibe un 85% las contracciones peristálticas de íleon de cobayo, así como ejerce un efecto potencializador dosis-dependiente de hasta un 88% en el efecto hipotónico inducido por el pentobarbital sódico, sin embargo no se registró

ningún efecto anticonvulsivo inducido por G-B, demostrando así la existencia de otros componentes en el extracto de *G. glauca* con un potencial efecto depresor sobre el sistema nervioso central (Tortoriello & Ortega, 1993).

Por otra parte, resultados de pruebas electrofisiológicas han evidenciado la existencia del efecto modulador producido por G-B sobre la actividad neuronal del área tegmental ventral (ATV) y aunque se observó una disminución en la frecuencia de disparo de neuronas GABAérgicas, los resultados evidenciaron un mayor efecto inhibitorio sobre la frecuencia de descarga de neuronas dopaminérgicas, lo cual podría indicar una inhibición selectiva de G-B hacia las neuronas dopaminérgicas del ATV (Tortoriello *et al.*, 1998; Prieto-Gómez *et al.*, 2003). Similarmente, por medio de pruebas electrofisiológicas Jiménez-Ferrer y cols., en el año 2011 evaluaron el efecto de G-B sobre la frecuencia de la actividad eléctrica del hipocampo dorsal de ratas; los resultados obtenidos evidenciaron que la administración de G-B modifica la frecuencia de los disparos espontáneos de neuronas hipocampales, específicamente de la región CA1 y pese a que no lograron determinar las poblaciones neuronales involucradas en dicho efecto modulador, se sugirió que G-B actúa como un modulador en los sistemas de neurotransmisión involucrados en la patología de la ansiedad.

En contraste, resultados obtenidos en un ensayo clínico aleatorizado en el que se evaluó el posible efecto ansiolítico de G-B durante diez semanas, evidenciaron la efectividad, tolerabilidad y seguridad terapéutica de G-B como un tratamiento en pacientes diagnosticados con ansiedad generalizada (Romero-Cerecero *et al.*, 2019).

#### **2.4- Galphimine-A**

Galphimine-A (G-A), es un triterpeno que también se considera como uno de los principales responsables de los efectos depresores de *G. glauca* sobre el sistema nervioso central. Resultados obtenidos al evaluar la administración oral de diferentes dosis de G-A a ratones que fueron sometidos a pruebas conductuales (campo abierto y laberinto elevado), evidenciaron una gran similitud entre el efecto sistémico dosis-dependiente inducido por G-A y el efecto sistémico inducido por el

Diazepam, por el contrario resultados de pruebas electrofisiológicas exhibieron el nulo efecto de G-A sobre la tasa de disparo de la amígdala basolateral, lo cual sugiere que el efecto sistémico inducido por G-A es dosis-dependiente y este no se encuentra asociado con efectos sedativos (Avilés-Montes *et al.*, 2015).

Por otra parte, con el objetivo de determinar el proceso de transferencia de G-A en la interfase sangre-cerebro, Abarca-Vargas y cols., en el año 2014 llevaron a cabo un estudio farmacocinético, en el cual por medio de la administración de G-A y su posterior cuantificación en plasma y tejido cerebral, obtuvieron tanto la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de este triterpeno presente en plasma ( $3.42 \mu\text{g/mL}$ ), así como la  $C_{m\acute{a}x}$  de G-A presente en el cerebro, siendo que esta última se presentó en un tiempo ( $T_{m\acute{a}x}$ ) de 81.6 minutos con un decaimiento gradual ( $0.32 \mu\text{g/mL}$ ) después de 24 horas de su administración; de modo que los resultados obtenidos demostraron que G-A atraviesa la barrera hematoencefálica debido a las propiedades lipofílicas de la molécula y ya que las diversas Galphimines poseen una estructura altamente similar, se puede inferir que estas moléculas tienen el potencial de cruzar la barrera hematoencefálica.

### **3.- Planteamiento del problema**

Con base en los antecedentes descritos en donde diversos autores han propuesto que el efecto depresor sobre el sistema nervioso central inducido tanto por G-B como por G-A, es un efecto ansiolítico y ya que los ansiolíticos son moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA<sub>A</sub>, se podría inferir que el mecanismo de acción de las Galphimines se encuentra asociado con sistemas de neurotransmisión GABAérgicos.

No obstante, resultados obtenidos al evaluar el posible efecto modulador de la mezcla G-1-F-2 (constituida por G-B y G-A) sobre poblaciones neuronales estriatales en presencia de un bloqueador de los receptores GABA<sub>A</sub>, denominado Bicuculina (Figura suplementaria 1; Anexo uno) evidenciaron que el efecto inducido por dicha mezcla parece no estar relacionado con sistemas de neurotransmisión GABAérgicos. Y dado que la respuesta sináptica poblacional estriatal que se evaluó contiene un componente glutamatérgico y uno GABAérgico, además de la falta de literatura que esclarezca el mecanismo de acción de las Galphimines (G-B y G-A), así como a que se desconocen los circuitos neuronales involucrados en el efecto inducido por estas moléculas; en este trabajo se busca esclarecer el efecto modulador inducido por la mezcla G-1-F-2 sobre las sinapsis estriatales.

## **4.- Hipótesis**

Dado que la mezcla G-1-F-2 incrementa la amplitud de la espiga sináptica poblacional estriatal y ya que esta tiene un componente glutamatérgico y uno GABAérgico; suponemos que el efecto modulador inducido por la mezcla G-1-F-2 actúa sobre sistemas de neurotransmisión GABAérgicos o glutamatérgicos.

## **5.- Objetivos**

### **Objetivo general**

- Evaluar el efecto modulador de la mezcla G-1-F-2 sobre sinapsis estriatales.

### **Objetivos particulares**

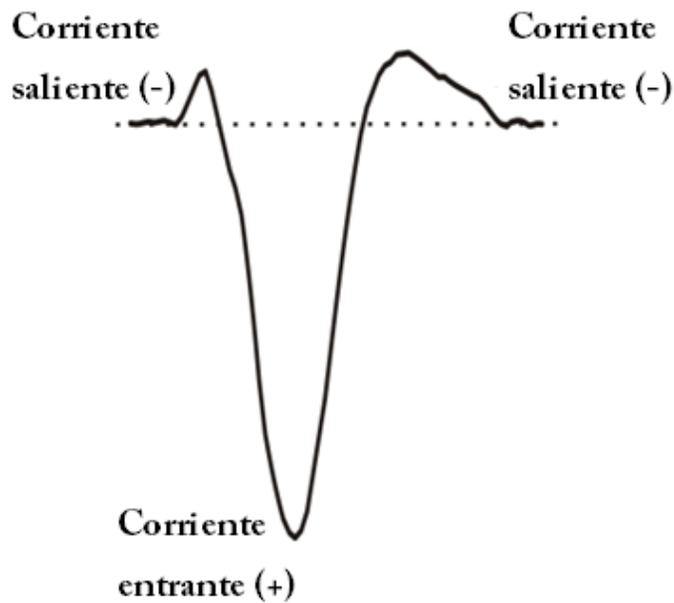
- Determinar si el efecto modulador de G-1-F-2 se encuentra relacionado con sistemas GABAérgicos o bien con sistemas glutamatérgicos.
- Definir los circuitos estriatales que se ven involucrados en el efecto modulador producido por la mezcla G-1-F-2
- Identificar si el efecto modulador producido por la mezcla G-1-F-2 actúa de manera presináptica o postsináptica.

## **6.- Consideraciones metodológicas**

### **6.1- Registro electrofisiológico de potenciales de campo**

En este trabajo se utilizó el registro electrofisiológico de potenciales de campo, ya que esta herramienta electrofisiológica permite el estudio de la actividad sináptica de un grupo o población de neuronas (Bretschneider & De Weille, 2006; Fanjul de Moles & Hiriart, 2008).

Los potenciales de campo son registros extracelulares evocados por la generación de corrientes iónicas denominadas espigas, las cuales se encuentran asociadas a una población neuronal, de modo que la amplitud de estas espigas depende directamente de tanto el número de neuronas que disparan sincrónicamente potenciales de acción, así como de la distribución de la población neuronal activa. Siendo una de las principales características biofísicas de las espigas poblacionales evocadas, su tendencia a formar una onda trifásica la cual es el producto de la diferencia en la localización de las corrientes entrantes activas (pozos) y las corrientes salientes (fuentes) del circuito eléctrico; de manera que en el registro de los potenciales de campo, las corrientes salientes se observan como deflexiones positivas mientras que las corrientes entrantes como deflexiones negativas, siendo el componente negativo el correspondiente a la despolarización de la membrana causada por la corriente entrante; es decir, cuando el potencial se aproxima al electrodo de registro, este detecta una corriente saliente (-) que se traduce como una onda positiva, al ser despolarizada la membrana por la corriente entrante (+) esta es detectada por el electrodo a manera de una onda negativa, finalmente al repolarizarse la membrana se detecta una segunda corriente saliente (-) y por consiguiente una segunda onda positiva (Fig.5) (Johnston & Miao-Sint, 1995; Fanjul de Moles & Hiriart, 2008; Silva-Pereyra, 2011).

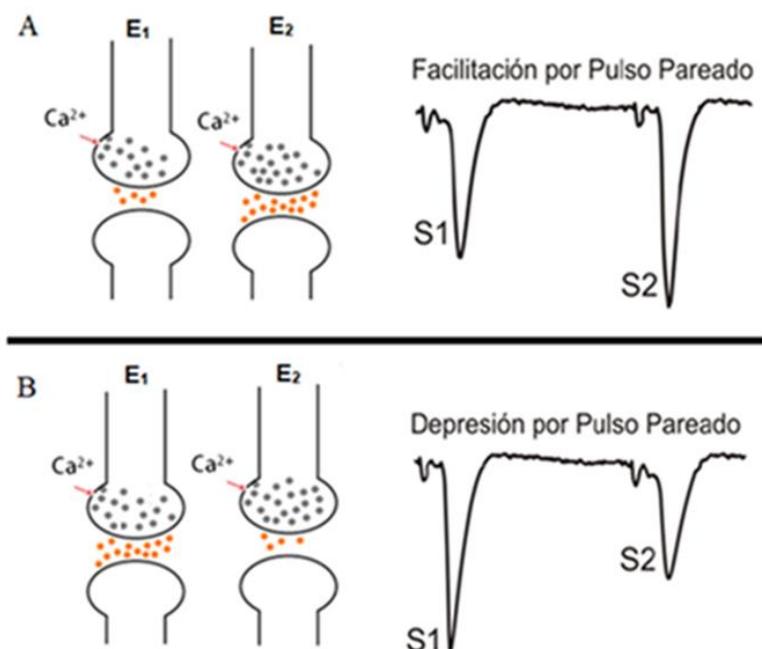


**Figura 5. Representación de un potencial de campo.** Los potenciales de campo tienden a una forma trifásica debido a la manera de propagación del potencial a lo largo de la neurona. (imagen tomada de Morán, 2013).

## 6.2- Protocolo de pulso pareado

El protocolo de pulso pareado es una metodología que consiste en la aplicación de dos estímulos de la misma intensidad y duración separados por un corto periodo de tiempo, de manera que la respuesta obtenida ante el segundo estímulo se ve influenciada por el primero, resultando en el incremento o decremento de la amplitud de la respuesta sináptica; esto se explica por medio de la “Teoría de calcio residual” propuesta por Katz & Miledi en 1968, en la que se propone que al ejercer un primer estímulo ( $E_1$ ) la membrana de la terminal presináptica se despolariza, lo que permite la activación y apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje facilitando de este modo el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, propiciando la fusión de las vesículas sinápticas (las cuales contienen y transportan diferentes neurotransmisores) con la membrana presináptica, liberando así el neurotransmisor al espacio sináptico, no obstante ya que los mecanismos de amortiguación de  $Ca^{2+}$  intracelular son más lentos en comparación a los mecanismos de entrada de este ion, al aplicar un segundo estímulo ( $E_2$ ) el  $Ca^{2+}$  que ingresa con este nuevo estímulo se integra (suma) al  $Ca^{2+}$  remanente del primer estímulo y por tanto se incrementa la probabilidad de fusión de las vesículas sinápticas con la membrana, lo que a su

vez se traduce en el incremento de la liberación del neurotransmisor, de manera que a este fenómeno se le conoce como facilitación por pulso pareado (PPF por sus siglas en inglés) (Fig.6A) ya que la amplitud de la segunda respuesta es mayor en comparación a la amplitud de la primera, debido a la facilitación en la liberación del neurotransmisor. Por el contrario, existe la probabilidad de que la intensidad del primer estímulo facilite una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  a la terminal presináptica, promoviendo la liberación de la mayoría del neurotransmisor existente en la terminal, de modo que la eficacia del segundo estímulo será menor en comparación a la del primero debido a la falta de neurotransmisor disponible, ocasionando un fenómeno de depresión en el que la amplitud de la segunda respuesta es menor en comparación a la amplitud de la primera respuesta, al cual se le conoce como depresión por pulso pareado (PPD por sus siglas en inglés) (Fig.6B) (Katz & Miledi, 1968; Johnston & Miao-Sin, 1995; Colino *et al.*, 2002; Fanjul de Moles & Hiriart, 2008).



**Figura 6. Facilitación y Depresión por pulso pareado.**

En donde los círculos grises representan las vesículas sinápticas y los círculos naranjas el neurotransmisor; E1= primer estímulo, E2= segundo estímulo, S1= primera respuesta, S2= segunda respuesta. En A se observa el fenómeno de facilitación por pulso pareado y en B el fenómeno de depresión por pulso pareado (modificada de Morán, 2013).

## 7.- Materiales y Métodos

### 7.1- Animales

En este trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 de 3 a 4 semanas de edad. Durante el periodo experimental los individuos fueron alojados en grupos de cinco, en cajas de acrílico transparente (Plexiglás), bajo ciclos de 12/12 luz/obscuridad, a una temperatura de 24-26°C, con libre acceso a alimento y agua.

### 7.2- Fármacos

Se utilizó la mezcla G-1-F-2, la cual fue caracterizada bajo la metodología descrita por Tortoriello en 1991 y proporcionada por el Dr. Alfredo Ortega Hernández quien se encuentra adscrito al Instituto de Química de la UNAM. Para la aplicación de dicha mezcla, fue necesario realizar una dilución 1 mg/mL, en la que, la mezcla G-1-F-2 fue disuelta en Dimetil-sulfóxido (DMSO), aplicando 100  $\mu$ L de G-1-F-2 por cada 10 mL de solución fisiológica, generando así, una concentración final de 10  $\mu$ g/mL.

Por otra parte, se utilizó el antagonista competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub> llamado Bicuculina, en una concentración de 10  $\mu$ M, ya que en esta concentración se inhibe la respuesta GABAérgica aislando así la respuesta glutamatérgica proyectada desde la corteza hacia el estriado (Mendoza *et al.*, 2014; Gómez-Pineda *et al.*, 2018; Torres-Cruz *et al.*, 2019); además se utilizó un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, llamado Memantina, en una concentración de 10  $\mu$ M, ya que se ha reportado que a esta concentración inhibe entre un 60 y 70% la respuesta sináptica poblacional estriatal (Chen *et al.*, 1992; Parsons *et al.*, 1993; Frankiewicz *et al.*, 1996; Parsons *et al.*, 1996; Parsons *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010; Garcia-Munoz *et al.*, 2015) ambos fármacos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México.

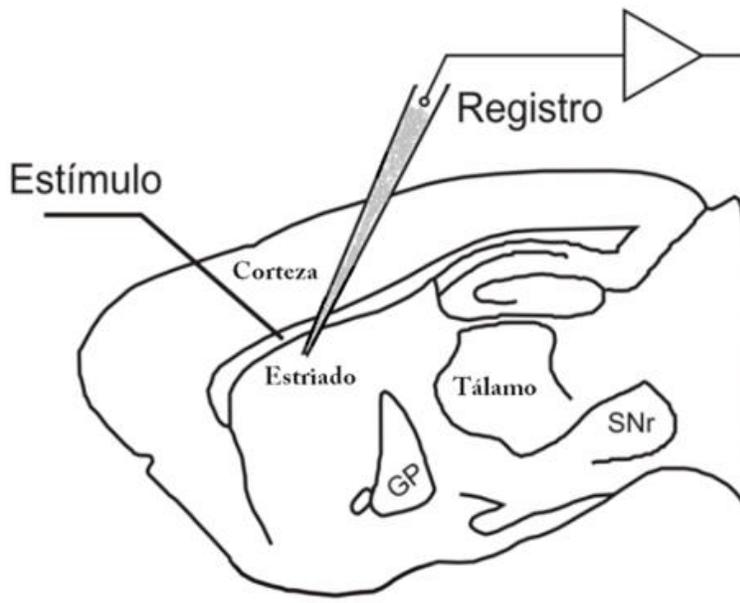
Adicionalmente se utilizó el modulador alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A</sub>, llamado Diazepam (Relazepam; PISA), del cual se llevó a cabo una curva concentración-respuesta, esto con la finalidad de determinar la concentración de este fármaco a utilizar.

### **7.3- Preparación de tejido**

Los ratones fueron anestesiados con éter etílico en una cámara de inducción, previamente a ser sacrificados por decapitación, inmediatamente después del sacrificio se realizó la extracción cerebral, una vez extirpado el cerebro, se retiraron tanto el cerebelo como los bulbos olfatorios. El cerebro restante fue colocado en una solución fisiológica isotónica (simula el líquido cerebro-espinal) a 4°C saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> y con un pH de 7.4, constituida por: CaCl<sub>2</sub> (2 mM), NaCl (125 mM), KCl (3 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), NaHCO<sub>3</sub> (26 mM), Ácido ascórbico (0.2 mM), Tiourea (0.2 mM) y Glucosa (10 mM). Posteriormente los hemisferios cerebrales fueron separados y colocados en un vibratomo (Pelco® 102, Vibratome 1000 plus, USA) donde se realizaron cortes sagitales de 400 µm. Subsecuentemente las rebanadas se mantuvieron en solución fisiológica isotónica saturada constantemente con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> a temperatura ambiente, por hora y media ya que en estas condiciones se permite la viabilidad del tejido por un periodo mayor a 10 horas (Mendoza, 2001; Mendoza *et al.*, 2014).

### **7.4- Registro electrofisiológico**

Las rebanadas cerebrales obtenidas, fueron colocadas en una cámara de registro electrofisiológico con una perfusión constante de 1±0.5 ml/min de solución fisiológica saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, a una temperatura constante de 32±0.5°C. Los registros electrofisiológicos se realizaron en la parte dorsolateral del estriado, estimulando con un electrodo bipolar ubicado sobre el cuerpo calloso, registrando la respuesta sináptica con un segundo electrodo de borosilicato (lleno con solución fisiológica) situado dentro del estriado, posicionado de dos a tres milímetros de diámetro del electrodo de estimulación (Fig.7). Todos los registros se realizaron *in vitro* bajo el protocolo de pulso pareado, en el cual los pulsos se encontraban separados por un periodo de 50 milisegundos a una frecuencia de 0.1 Hz (Mendoza *et al.*, 2014).



**Figura 7. Esquema representativo del método electrofisiológico de estimulación y registro.** En donde GP= Globo Pálido, SNr= Sustancia Nigra reticulata. Se observa el posicionamiento tanto del electrodo de estimulación que se encuentra en el cuerpo calloso, así como, el electrodo de registro ubicado en el cuerpo estriado (imagen tomada y modificada de Morán, 2013).

Ahora bien, con la finalidad de apreciar los cambios en la amplitud de la respuesta sináptica poblacional evocada (RSPE), inducidos por los diferentes fármacos a evaluar, al inicio de cada experimento se llevó a cabo una curva intensidad-amplitud, ya que ésta, establece la relación existente entre la intensidad de estimulación aplicada y la magnitud de la RSPE. Similarmente, con el fin de comprobar que los cambios en la amplitud de la RSPE eran el producto de la aplicación de los diferentes fármacos utilizados y no la consecuencia de inestabilidades originadas por el estado fisiológico del tejido (debido a un mal desarrollo metodológico) o a la duración de los experimentos, se realizaron una serie de registros de larga duración denominados “controles largos”, los cuales consistieron en registrar la actividad basal de la RSPE estriatal por un periodo de 30 minutos.

Asimismo, al inicio de cada experimento se llevó a cabo el registro de la actividad sináptica estriatal en su estado basal durante un periodo de 10 minutos, al cual se le denominó “control corto”.

### **7.5-Análisis de resultados**

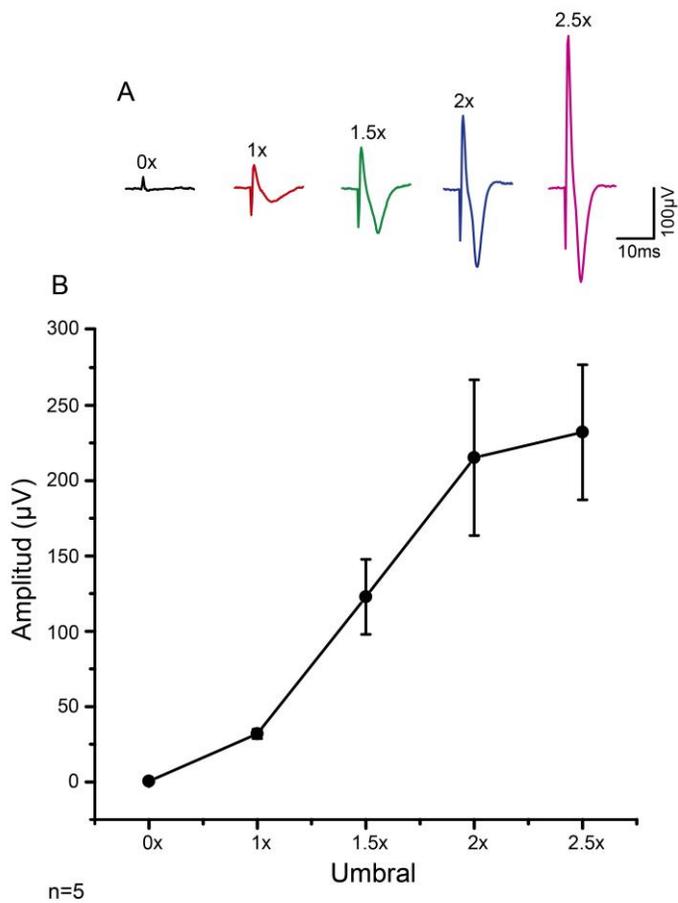
Los datos obtenidos fueron procesados y analizados con el software Origin Pro-9.1.0 (USA), la amplitud de la respuesta sináptica poblacional fue normalizada al 100% para cada uno de los grupos evaluados, utilizando como referencia los 10

primeros minutos de cada experimento (control corto). Por su parte los análisis estadísticos (prueba de t pareada, prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, prueba de normalidad Shapiro-Wilk, análisis de varianza-ANOVA no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis, prueba de comparación múltiple de Dunn's) de los datos obtenidos fueron realizados con ayuda del software SigmaPlot 12.0, estableciendo una significancia estadística de  $P \leq 0.05$ .

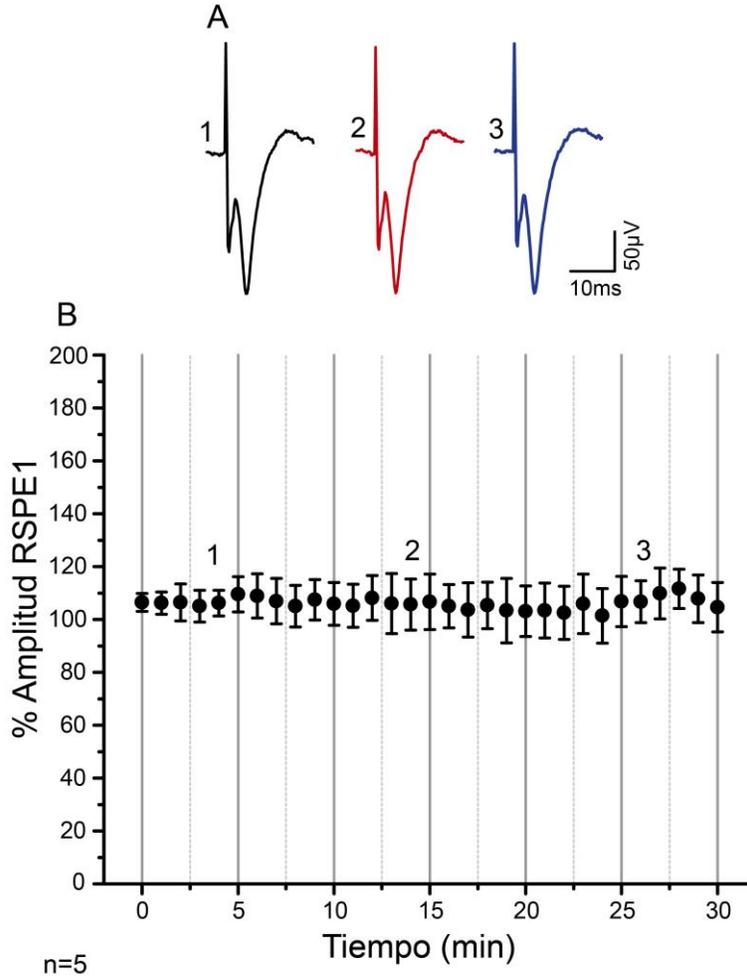
## 8.- Resultados

Para cada uno de los registros obtenidos se realizó una curva intensidad-amplitud, ya que con esta se determinó la amplitud media necesaria para evitar la saturación de la RSPE y así poder observar los efectos de los diferentes fármacos a evaluar. En la Figura 8B se exponen los resultados de la curva intensidad-amplitud, en donde se puede apreciar la relación entre el umbral (intensidad de estimulación necesaria para evocar una respuesta sináptica poblacional) y la respuesta sináptica poblacional evocada, es posible apreciar como al ejercer 1 umbral se observa un ligero incremento en la amplitud de la RSPE, no obstante es hasta estimular con 1.5 veces umbral el que se evoca la mitad de la amplitud total de la RSPE registrada, por el contrario al ejercer 2 veces umbral la respuesta sináptica comienza a saturarse y es hasta ejercer 2.5 veces umbral que la respuesta sináptica alcanza su máxima amplitud y su saturación, siendo así 1.5 umbral la estimulación media ideal para evaluar y registrar los cambios en la actividad sináptica poblacional.

Asimismo, tal y como se muestra en la Figura 9B al no observar variaciones significativas en la amplitud de la respuesta sináptica poblacional evocada ante el primer estímulo (RSPE1) en su estado basal, registrado por un periodo de 30 min, se demostró la viabilidad del tejido obtenido tanto para el desarrollo experimental como para realizar la evaluación de los diferentes fármacos.



**Figura 8. Curva intensidad-amplitud.** En donde la intensidad de estimulación necesaria para evocar una respuesta sináptica poblacional se expresa en umbral y la amplitud registrada se encuentra expresada en  $\mu\text{V}$  (micro-volts). En A se observan trazos representativos de la curva junto con el número de veces umbral en los que fueron estimulados. En B se observa la curva intensidad-amplitud, así como la relación entre los umbrales y la respuesta sináptica poblacional evocada. (n=5, Prom $\pm$ SE).



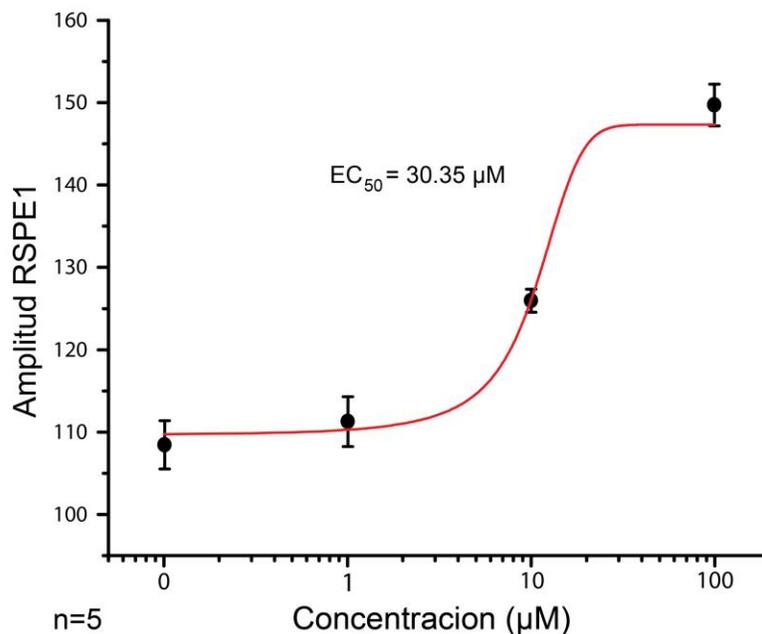
**Figura 9. Control Largo.** Donde RSPE1= Respuesta sináptica poblacional evocada ante el primer estímulo. En A se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RSPE1 en su estado control, registrada por un periodo de 30 minutos, así como insertos en la parte superior, se observan los trazos representativos del curso temporal registrado donde los números indican la parte del curso representado (n=5, Prom±SE).

### 8.1.- Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre la respuesta sináptica poblacional estriatal, en presencia de Diazepam

Debido a la existencia de evidencia que sugiere que tanto G-B como G-A inducen un efecto ansiolítico sistémico, y ya que los ansiolíticos convencionales son fármacos que actúan de manera selectiva sobre los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub>, incrementando la afinidad de este receptor por el ácido γ-aminobutírico, resultando en la facilitación de la respuesta GABAérgica (Brunton *et al.*, 2007; Waldman & Terzic, 2010; Lorenz-Guertin *et al.*, 2019); llevamos a cabo una serie de experimentos en los que se evaluó el efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones

neuronales estriatales en presencia de Diazepam (modulador alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A</sub>). Para lo cual y con la finalidad de determinar la concentración media ideal de Diazepam a utilizar se realizó una curva concentración-respuesta.

En la Figura 10 se exponen los resultados de la curva concentración-respuesta obtenidos, en donde se aprecian los cambios en la amplitud de la RSPE1 en respuesta a las diferentes concentraciones de Diazepam evaluadas (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), los resultados de la ecuación  $y=A1+(A2-A1)/(1+10^{((\text{LOG}x0-x)*p))}$  la cual presenta una Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) reducida=2.07081E-4 y un ajuste de  $R^2=0.94265$ , evidenciaron que la dosis media efectiva o  $\text{EC}_{50}$  de Diazepam es de 30.35  $\mu\text{M}$ , de forma que se decidió utilizar una concentración final de 35  $\mu\text{M}$  de Diazepam para el desarrollo de los experimentos.



**Figura 10. Curva Concentración-Respuesta.**

En donde las concentraciones de Diazepam evaluadas fueron 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ , mientras que la amplitud de la RSPE1 se encuentra expresada en orden de  $\mu\text{V}$ .

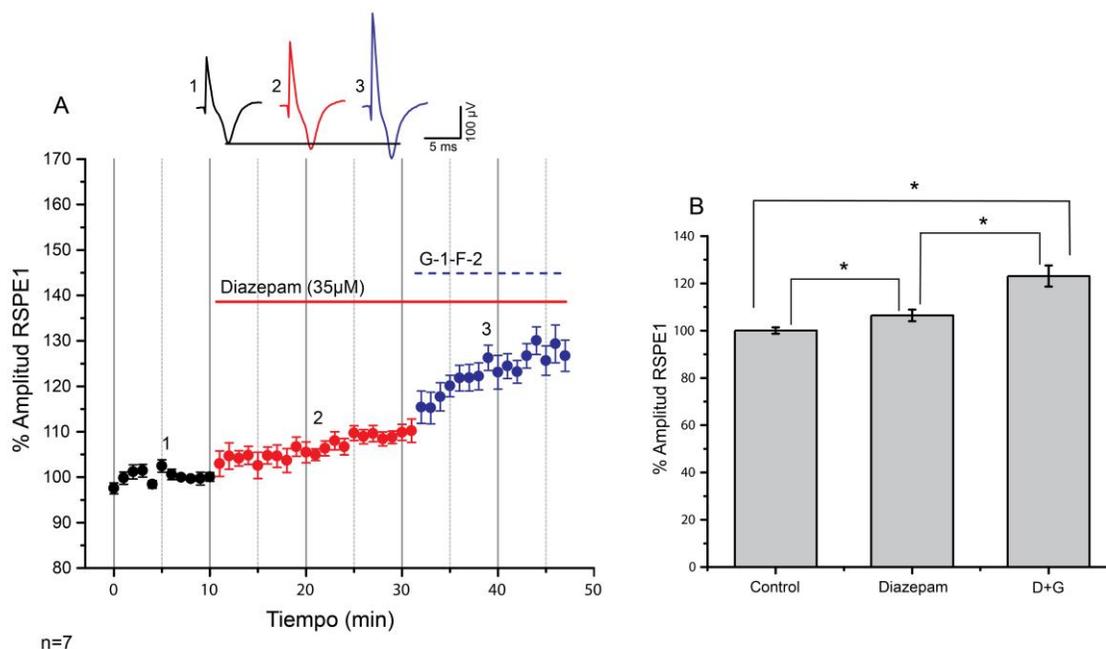
Una vez determinada la concentración de Diazepam a utilizar (35  $\mu\text{M}$ ), se procedió a realizar la evaluación del efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales en presencia de este modulador, de forma que se llevó cabo el registro del control corto para subsecuentemente agregar Diazepam directamente al dispensador del baño de la cámara de registro, posteriormente y de manera

conjunta se agregó la mezcla G-1-F-2, registrando los cambios en la actividad sináptica poblacional estriatal.

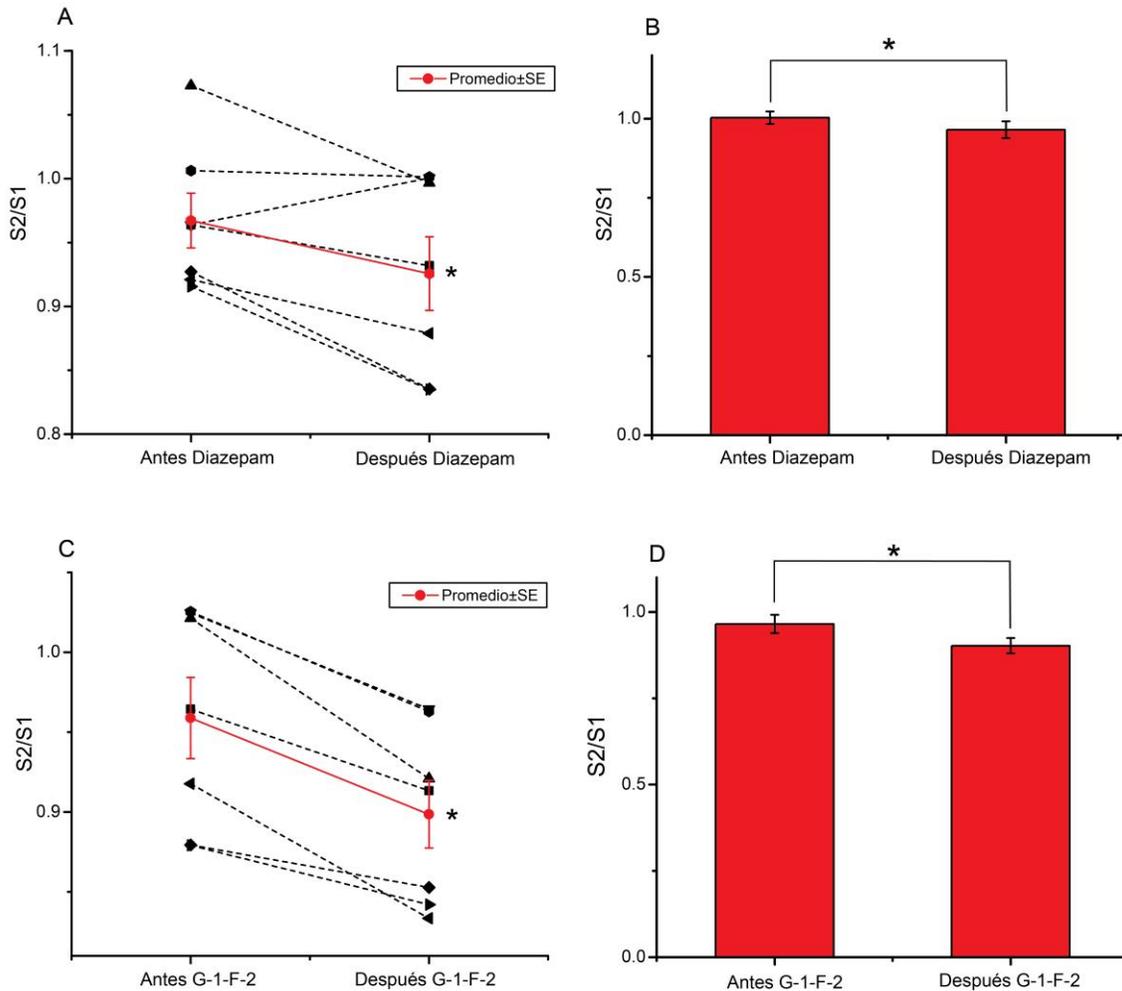
En la Figura 11A se aprecia el comportamiento de la RSPE1 (respuesta sináptica poblacional evocada ante el primer estímulo) registrado, se aprecia como al aplicar 35  $\mu$ M de Diazepam se induce un ligero incremento significativo ( $P=<0.001$ ) del 6% en la amplitud de la RSPE1 registrada (Control= $100.07792\pm 1.36122$  vs Diazepam= $106.46717\pm 2.44707$ ), similarmente se observa un incremento del 17% en la amplitud de la RSPE1 cuando se agrega la mezcla G-1-F-2 al medio (Diazepam= $106.46717\pm 2.44707$  vs D+G-1-F-2= $123.10923\pm 4.43492$ ), lo que en comparación con la respuesta control representa un incremento aproximado del 23% en la amplitud registrada (Control= $100.07792\pm 1.36122$  vs D+G-1-F-2= $123.10923\pm 4.43492$ ). Por su parte los resultados del análisis estadístico ANOVA no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis ( $H_2=40.776$  y  $P=<0.001$ ) evidenciaron la existencia de diferencias significativas entre las condiciones evaluadas, siendo que los resultados del análisis estadístico post hoc de la prueba de Dunn's ( $P=<0.05$ ) demostraron diferencias significativas entre las condiciones "Control vs Diazepam", "Diazepam vs D+G-1-F-2" y "Control vs D+G-1-F-2" (Fig.11C).

Por otra parte, en la Figura 12 se presenta la relación de pulso pareado (PPR por sus siglas en ingles) de las condiciones evaluadas en este grupo experimental. En la Figura 12A se observa la diferencia en el cociente de la relación "Respuesta Sináptica dos/Respuesta Sináptica uno" (S2/S1) antes y después de la aplicación de Diazepam y dado que los resultados del análisis estadístico ( $t_6=3.298$  y  $P=0.016$ ) evidenciaron la existencia de diferencias significativas entre la respuesta sináptica uno (S1) y la respuesta sináptica dos (S2) (Fig.12B), se determinó que el efecto inducido por este fármaco es modulado por mecanismos presinápticos; similarmente los resultados obtenidos al evaluar la relación de pulso pareado antes y después de la administración de G-1-F-2 (Fig.12C) evidenciaron la existencia de diferencias significativas ( $t_6=4.713$  y  $P=0.003$ ) entre S1 y S2 (Fig.12D) demostrando de esta forma que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 se encuentra modulado

por mecanismos de tipo presinápticos. Ahora bien, debido a los datos expuestos, así como a datos previamente obtenidos (Figura suplementaria 1, Anexo uno) se es posible deducir que el efecto modulador de la mezcla G-1-F-2 no se encuentra mediado por sistemas GABAérgicos.



**Figura 11. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales en presencia de Diazepam.** Donde RSPE1= Respuesta Sináptica Poblacional Evocada ante el Primer Estímulo; D+G-1-F-2= efecto conjunto de Diazepam+G-1-F-2; las diferencias significativas entre los grupos evaluados se muestran con un asterisco. En A se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RSPE1 registrada durante el curso temporal (10 min de control corto, 20 min de efecto de Diazepam y 15 min del efecto conjunto Diazepam+G-1-F-2), así como insertos en la parte superior, se muestran trazos representativos del curso temporal registrado donde los números indican la parte del curso representado. Finalmente, en B se observa una gráfica de barras representativa de los cambios en la amplitud de la RSPE1 registrados durante las diferentes condiciones evaluadas (n=7; Prom±SE).



n=7

**Figura 12. Relación de Pulso Pareado (PPR) antes y después de la aplicación de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Diazepam.** Donde cada uno de los símbolos con líneas punteadas representa cada uno de los experimentos realizados, mientras que la línea roja continua representa el promedio de estos, las diferencias significativas entre los grupos evaluados se muestran con un asterisco. En A se observa la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de Diazepam, mientras que en B se observa una gráfica representativa de la relación S2/S1. Por su parte en C se muestra la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de G-1-F-2, de igual forma en D se observa una gráfica de barras representativa de la relación S2/S1 (n=7; Prom±SE).

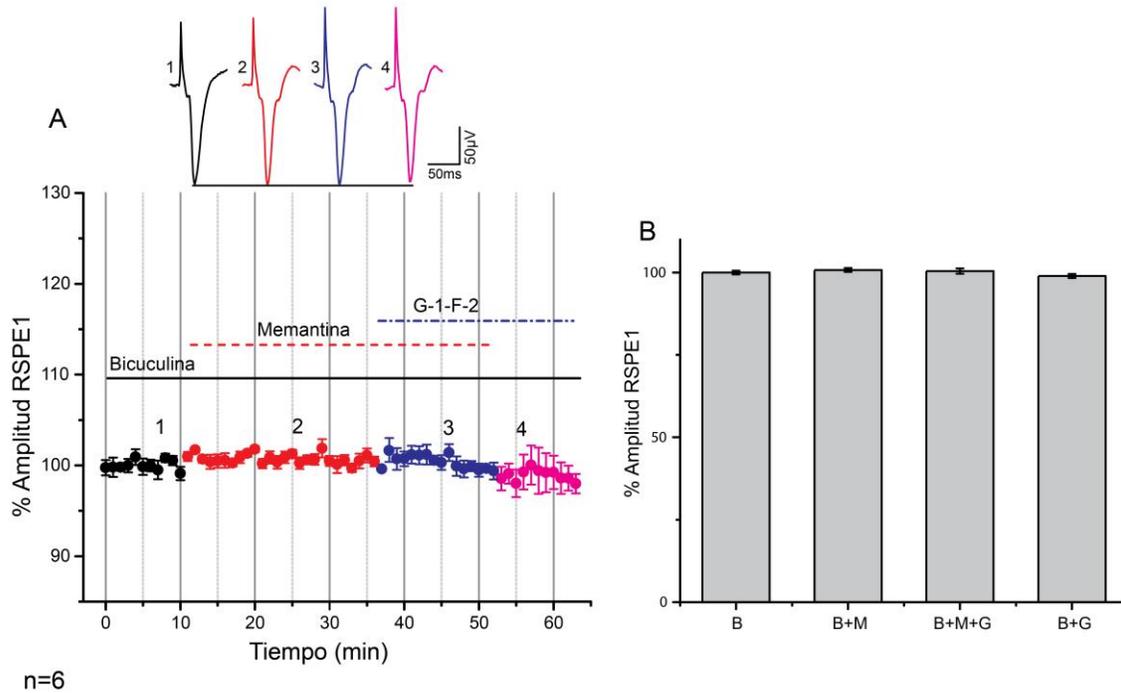
## **8.2.- Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre la respuesta sináptica poblacional estriatal, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA**

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia, que sugiere que el efecto modulador inducido por la mezcla G-1-F-2 no se encuentra mediado por sistemas de naturaleza GABAérgica, por lo que llevamos a cabo la evaluación del efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales y su relación con sistemas glutamatérgicos. De modo que se registró el comportamiento de la RSPE1 en presencia de Bicuculina para consecutivamente y de manera conjunta con este fármaco agregar Memantina al medio, subsecuentemente en presencia del efecto conjunto Bicuculina+Memantina (B+M) se agregó la mezcla G-1-F-2 al dispensador de la cámara de registro y finalmente se suspendió la administración de Memantina.

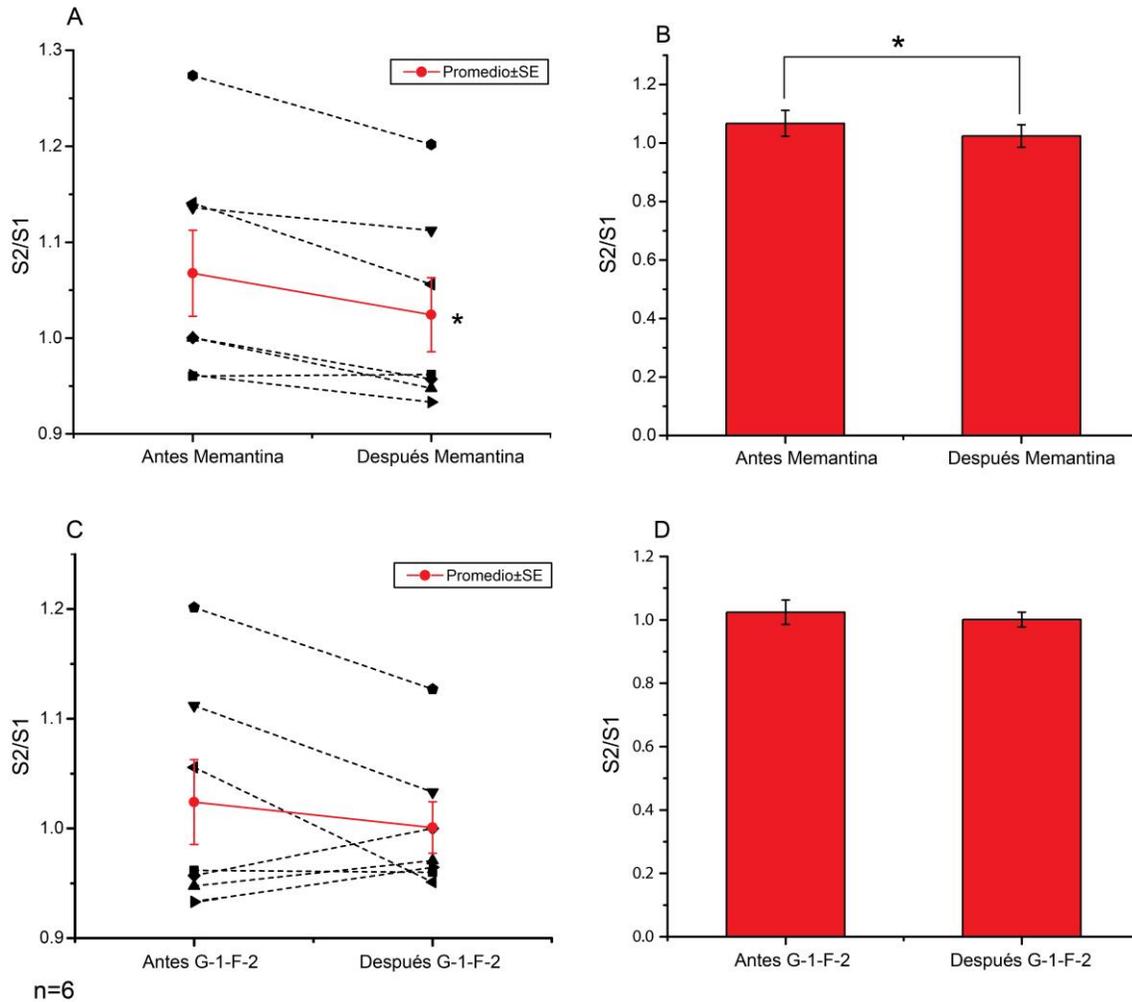
En la Figura 13A se puede observar el comportamiento de la RSPE1 registrado, se aprecia como al agregar Memantina en presencia de Bicuculina esta no induce ningún cambio en la amplitud de la RSPE1 (Bicuculina= $100 \pm 0.55133$ ; B+M= $100.7484 \pm 0.58818$ ), similarmente tampoco se observaron cambios en la amplitud de la RSPE1 al agregar G-1-F-2 al medio, el cual se encontraba en presencia del efecto conjunto de Bicuculina+Memantina (B+M= $100.7484 \pm 0.58818$ ; B+M+G= $100.41154 \pm 0.81629$ ); por el contrario, al suspender la aplicación de Memantina se observa una disminución de aproximadamente el 2% en la amplitud de la RSPE1 (B+M+G= $100.41154 \pm 0.81629$ ; B+G= $98.90953 \pm 0.61943$ ). Los resultados del análisis estadístico ANOVA no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis ( $H_3=29.266$  y  $P=<0.001$ ) evidenciaron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas, sin embargo, los resultados del análisis estadístico post hoc de la prueba de Dunn's ( $P=<0.05$ ) demostraron que no existen diferencias significativas entre ninguna de las condiciones evaluadas (Fig.13C). Ahora bien, es preciso mencionar que del 100% de los experimentos registrados ( $n=9$ ), en el 66% ( $n=6$ ) se registró una tendencia similar en el comportamiento de la amplitud de RSPE1 (datos descritos previamente), mientras que en el 22% de los experimentos ( $n=2$ ) se registró un incremento de aproximadamente el 15% en la amplitud de la RSPE1 a causa de la aplicación de  $10 \mu\text{M}$  de Memantina (Figura suplementaria 2, Anexo uno), por el contrario en el 11% ( $n=1$ ) restante se registró un decremento

aproximado del 10% en la amplitud de la RSPE1, inducido por la aplicación de Memantina (10 $\mu$ M) (Figura suplementaria 3, Anexo uno); en ambos casos al agregar la mezcla G-1-F-2 al medio, esta no indujo variaciones significativas sobre la amplitud de la RSPE1 registrada por lo que es altamente probable que el comportamiento de estos experimentos se deba principalmente al estado fisiológico en el que se encontraba el tejido al momento de realizar el experimento.

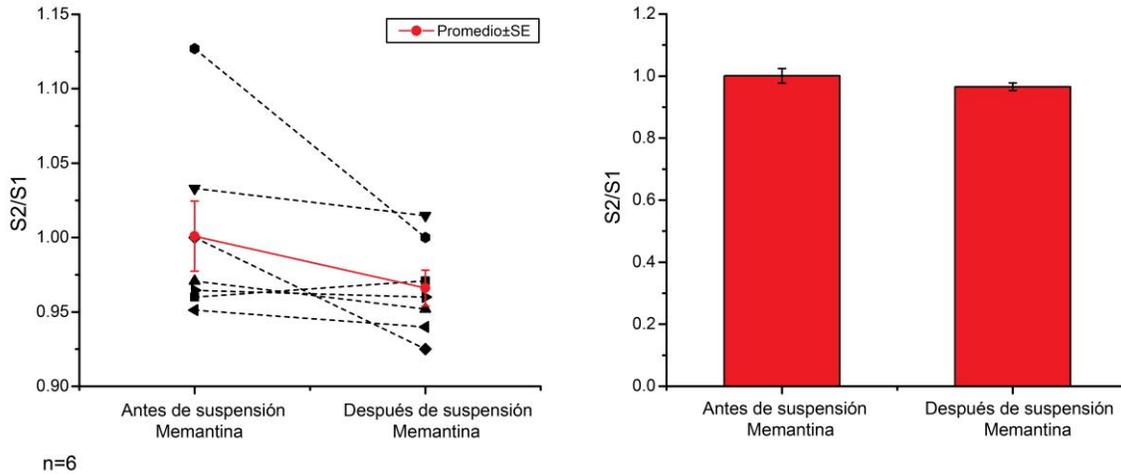
Por su parte, los resultados de la relación de pulso pareado o PPR evidenciaron cambios significativos ( $t_5=3.268$  y  $P=0.022$ ) en el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de Memantina (Fig.14A), de forma que se puede inferir que el efecto inducido sobre la RSPE1 por la Memantina es mediado por mecanismos presinápticos, por el contrario los resultados del análisis de PPR obtenidos al evaluar la relación S2/S1 antes y después de la administración de la mezcla G-1-F-2 (Fig.14C) demostraron la falta de diferencias significativas ( $t_5=1.427$  y  $P=0.213$ ) en el cociente de esta relación, similarmente al evaluar la relación S2/S1 antes y después de suspender la administración de Memantina (Fig.15A) no se observaron diferencias significativas en el cociente obtenido ( $t_5=1.391$  y  $P=0.223$ ), por lo que se puede inferir que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 en presencia de Memantina se encuentra mediado por mecanismos postsinápticos.



**Figura 13. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA.** Donde RSPE1= Respuesta Sináptica Poblacional Evocada ante el Primer Estímulo; B+M= efecto conjunto de Bicuculina+Memantina; B+M+G= efecto conjunto de Bicuculina+Memantina+G-1-F-2; B+G= efecto de G-1-F-2 sobre la RSPE1 después de la suspensión en la aplicación de Memantina. En A se presenta normalizada y en porcentaje la amplitud de la RSPE1 registrada durante un curso temporal (10 minutos del efecto de Bicuculina, 25min del efecto conjunto B+M; 15min del efecto conjunto B+M+G y 10 minutos de efecto B+G), así como insertos en la parte superior, se muestran trazos representativos del curso temporal registrado donde los números indican la parte del curso representado. Finalmente, en B se observa una gráfica de barras representativa de los cambios en la amplitud de la RSPE1 registrados durante las diferentes condiciones evaluadas (n=6; Prom±SE).



**Figura 14. Relación de Pulso Paredado (PPR) antes y después de la aplicación de Memantina y la mezcla G-1-F-2.** Donde cada uno de los símbolos con líneas punteadas representa cada uno de los experimentos realizados, mientras que la línea roja continua representa el promedio de estos, las diferencias significativas entre los grupos evaluados se muestran con un asterisco. En A se muestra la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de Memantina, en B se muestra una gráfica representativa de esta relación. Por su parte, en C se muestra la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de G-1-F-2, de igual forma en D se muestra una gráfica representativa de esta relación (n=6; Prom±SE).



**Figura 15. Relación de Pulso Pareado (PPR) antes y después de la suspensión de Memantina.** Donde cada uno de los símbolos con líneas punteadas representa cada uno de los experimentos realizados, mientras que la línea roja continua representa el promedio de estos. En A se observa la relación S2/S1 de la respuesta sináptica registrada antes y después de suspender la aplicación de Memantina, por su parte, en B se muestra una gráfica representativa de esta relación, así como también se observa la falta de significancia estadística en el cociente de la relación S2/S1 (n=6; Prom±SE).

## 9.- Discusión

En los resultados expuestos en este trabajo, se puede apreciar cómo en presencia de Diazepam la mezcla G-1-F-2 induce un incremento significativo sobre la amplitud de la RSPE1 (respuesta sináptica poblacional evocada ante el primer estímulo) registrada y dado que el Diazepam estimula la unión del ácido  $\gamma$ -aminobutírico con los receptores GABA<sub>A</sub>, incrementando la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> (asociado al receptor) lo que resulta en la facilitación de la respuesta GABAérgica (Brunton *et al.*, 2007; Drexler *et al.*, 2010; Lorenz-Guertin *et al.*, 2019; Korol *et al.*, 2015) y debido a los estudios en los que se ha expuesto la alta similitud entre el efecto sistémico inducido tanto por Galphimine-B como por Galphimine-A y el efecto ansiolítico inducido por el Diazepam (Herrera-Ruiz<sup>1</sup> *et al.*, 2006; Herrera-Ruiz<sup>2</sup> *et al.*, 2006; Avilés-Montes, 2015), se podría pensar que los resultados obtenidos son producto de un posible efecto de cooperatividad entre estas dos sustancias, ya sea que el Diazepam facilite el efecto de G-1-F-2 o bien la mezcla G-1-F-2 potencie el efecto inducido por el Diazepam. No obstante, se ha reportado que el efecto sistémico inducido tanto por G-B como por G-A no se ve alterado cuando se es coadministrado con Picrotoxina (antagonista no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub>) (Herrera-Ruiz<sup>2</sup> *et al.*, 2006; Avilés-Montes, 2015; Santillán-Urquiza *et al.*, 2018) el cual a diferencia del Diazepam induce la inhibición de la respuesta GABAérgica, mediante la reducción de tanto la frecuencia como el tiempo de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> asociado al receptor, (Newland & Cull-Candy, 1992; Ramakrishnan & Hess, 2005; Olsen, 2006; Olsen, 2018; Masiulis *et al.*, 2019), lo que en contraste con los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales en presencia de Bicuculina, en donde se registró un incremento significativo en la amplitud RSPE1 inducido por el efecto de la mezcla G-1-F-2 (Figura suplementaria 1, Anexo uno) y dado que la Bicuculina inhibe competitivamente la unión del ácido  $\gamma$ -aminobutírico con el receptor GABA<sub>A</sub>, reduciendo la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> resultando en la inhibición de la respuesta GABAérgica (Andrews & Johnston, 1979; Johnston, 2013; Masiulis *et al.*, 2019), por consiguiente se puede concluir que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 no ejerce un efecto de cooperatividad con el

Diazepam, así como tampoco actúa sobre sistemas de neurotransmisión GABAérgicos estriatales, corroborando lo propuesto por Prieto-Gómez y cols., en 2003 y Avilés-Montes en 2015.

Ahora bien, para poder explicar el incremento en la amplitud de la RSPE1 registrado durante la administración de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Diazepam, es preciso considerar que la respuesta sináptica poblacional registrada es en sí la suma de las interacciones y conexiones intrínsecas de los circuitos cortico-estriatales, por lo que existe la probabilidad de que la mezcla G-1-F-2 evoque el incremento de la actividad glutamatérgica proyectada desde la corteza hacia el estriado estimulando la respuesta de las MSNs estriatales, lo que a su vez induciría un aumento en la liberación del neurotransmisor GABA y por tanto un incremento sobre la respuesta sináptica estriatal.

De forma que y con la finalidad de determinar la posible relación entre el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 y sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos, llevamos a cabo una serie de experimentos en los que se aisló la respuesta glutamatérgica proveniente de la corteza, evaluando los cambios de la respuesta sináptica poblacional estriatal inducidos por la mezcla G-1-F-2 en presencia de un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (Memantina), en los resultados obtenidos se puede apreciar como en presencia de 10 $\mu$ M de Memantina, la mezcla G-1-F-2 no induce cambios significativos sobre la amplitud de la RSPE1 registrada, así mismo se aprecia cómo al suspender la administración de este antagonista se registran variaciones sobre la amplitud de la RSPE1 y aunque estas variaciones no presentan una significancia estadística, dado que la Memantina bloquea la apertura del canal asociado al receptor NMDA impidiendo la salida del ion Mg<sup>2+</sup>, bloqueado el flujo iónico a través de éste, resultando en la inhibición de la respuesta glutamatérgica (Parsons *et al.*, 1993; Chen & Lipton, 2005; Chen & Lipton, 2006; Johnson & kotermanski, 2006; Parsons *et al.*, 2008), así como considerando el comportamiento de la respuesta sináptica registrada, esto nos proporciona información con la que es posible deducir que la mezcla G-1-F-2 favorece el incremento de las proyecciones excitatorias glutamatérgicas de la corteza hacia el

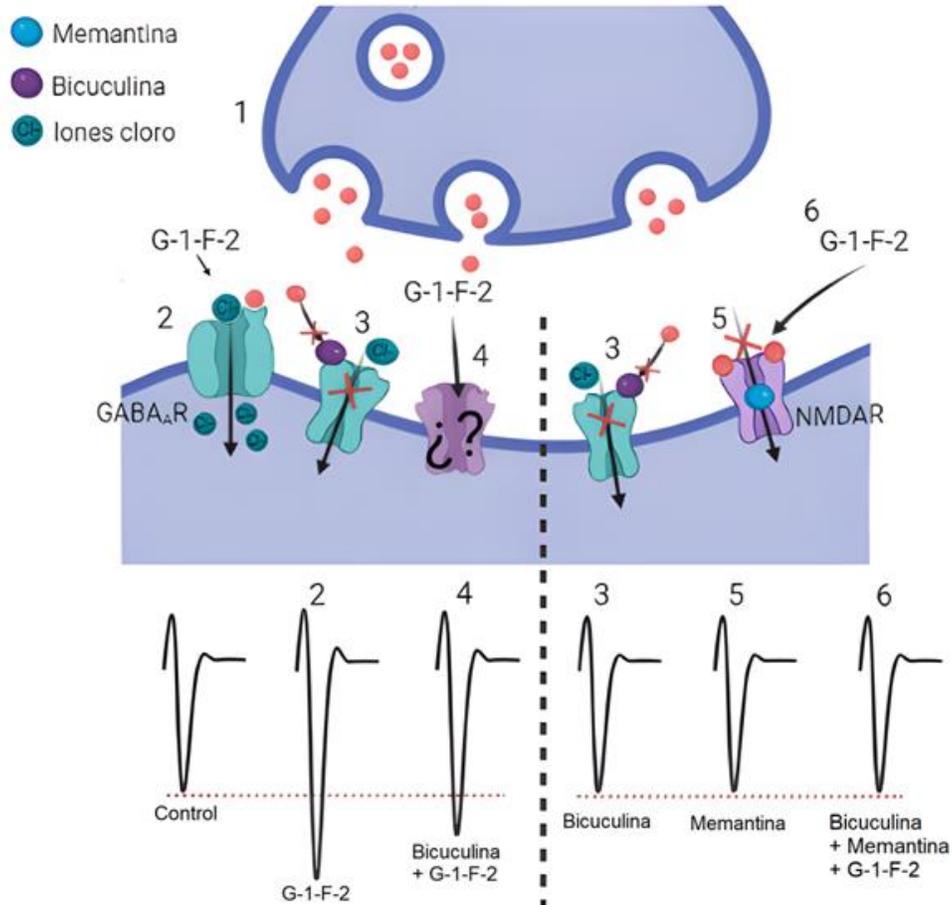
estriado lo que resulta en el incremento de la actividad sináptica poblacional estriatal.

Particularmente con los datos obtenidos, se podría inferir que G-B y G-A presentan una afinidad hacia los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, no obstante es preciso considerar que este tipo de receptores se asocian principalmente a procesos de plasticidad neuronal como la memoria y el aprendizaje, mientras que los receptores glutamatérgicos AMPA y en menor medida los receptores glutamatérgicos Kainato, se asocian a la transmisión sináptica rápida (Li & Tsien, 2009; Traynelis *et al.*, 2010; Purves *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2021), por consiguiente dados los resultados obtenidos hasta el momento solo podemos aseverar que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 y por tanto por Galphimine-B y Galphimine-A, actúa sobre sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos, en particular sobre los receptores NMDA.

Ahora bien, en el 22% de los experimentos registrados (Figura suplementaria 2, Anexo uno) se observó un incremento en la amplitud de la RSPE1 inducido por el efecto de la mezcla G-1-F-2 y si bien es cierto que estos experimentos no reflejan la tendencia del comportamiento de la respuesta sináptica promedio registrada; debido a los reportes de la inhibición selectiva que presenta Galphimine-B sobre neuronas dopaminérgicas del ATV (Tortoriello *et al.*, 1998; Prieto-Gómez *et al.*, 2003), así como a lo reportado por Santillán-Urquiza y cols., en el año 2018, quienes al evaluar la posible interacción entre el efecto de diferentes Galphimines (G-A, G-B y G-E) y el efecto inducido por el Haloperidol, concluyeron que existe una interacción entre estas moléculas y vías dopaminérgicas y ya que las neuronas espinosas medianas estriatales reciben aferencias dopaminérgicas mesencefálicas al igual que también expresan receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Waldman & Terzic, 2010; Gómez-Chavarín *et al.*, 2014) y dado que los receptores dopaminérgicos de tipo D1 pueden modular selectivamente las funciones de los receptores NMDA, directamente por medio de interacciones membranales proteína-proteína (Lee *et al.*, 2002), no podemos ignorar la probabilidad de que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 sobre la respuesta sináptica evocada se deba a que

las Galphimines actúen sobre sistemas de neurotransmisión dopaminérgicos, sin embargo no contamos con evidencia experimental suficiente como para aseverar esta conjetura.

Finalmente, los resultados del análisis de la relación de pulso pareado evidenciaron la existencia de diferencias significativas en el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la administración de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Diazepam, por lo que se demostró que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 registrado, se encuentra modulado por mecanismos de tipo presinápticos, coincidiendo con resultados previamente obtenidos (Figura suplementaria 4, Anexo uno) en donde se demostró que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales se encuentra modulado por mecanismos presinápticos. Por el contrario, los resultados del análisis de PPR demostraron la falta de diferencias significativas en el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la administración de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Memantina y aunque estos resultados proporcionan información con la que se podría inferir que el efecto de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Memantina se encuentra modulado por mecanismos postsinápticos, dado que la mezcla G-1-F-2 no induce ningún efecto sobre la RSPE1 en presencia de este antagonista, no es posible afirmar que en presencia de Memantina el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 se encuentre modulado por mecanismos postsinápticos.



**Figura 16. Esquema del posible efecto de G-1-F-2 sobre los receptores GABA<sub>A</sub> y NMDA.** En la figura se presenta un modelo esquemático del efecto inducido por la mezcla G-1-F-2 sobre la respuesta sináptica poblacional (RSP) estriatal, se aprecia como G-1-F-2 induce un incremento en la amplitud de la RSP, similarmente al bloquear la respuesta GABAérgica se registra un incremento en la amplitud de la RSP, inducido por el efecto de G-1-F-2; por el contrario, al bloquear tanto la respuesta GABAérgica, como el componente glutamatérgico correspondiente a los receptores NMDA, la mezcla G-1-F-2 no induce variaciones en la amplitud de la RSP estriatal. Insertos en la parte inferior se aprecian representaciones de los potenciales de campo de las condiciones señaladas; donde: 1=Terminal presináptica, 2=Efecto de G-1-F-2 sobre la RSP estriatal, 3= Bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub>, 4=Efecto de G-1-F-2 en presencia de Bicuculina, 5=Bloqueo de los receptores NMDA y 6=Efecto de G-1-F-2 en presencia de Bicuculina y Memantina.

## 10.- Conclusiones

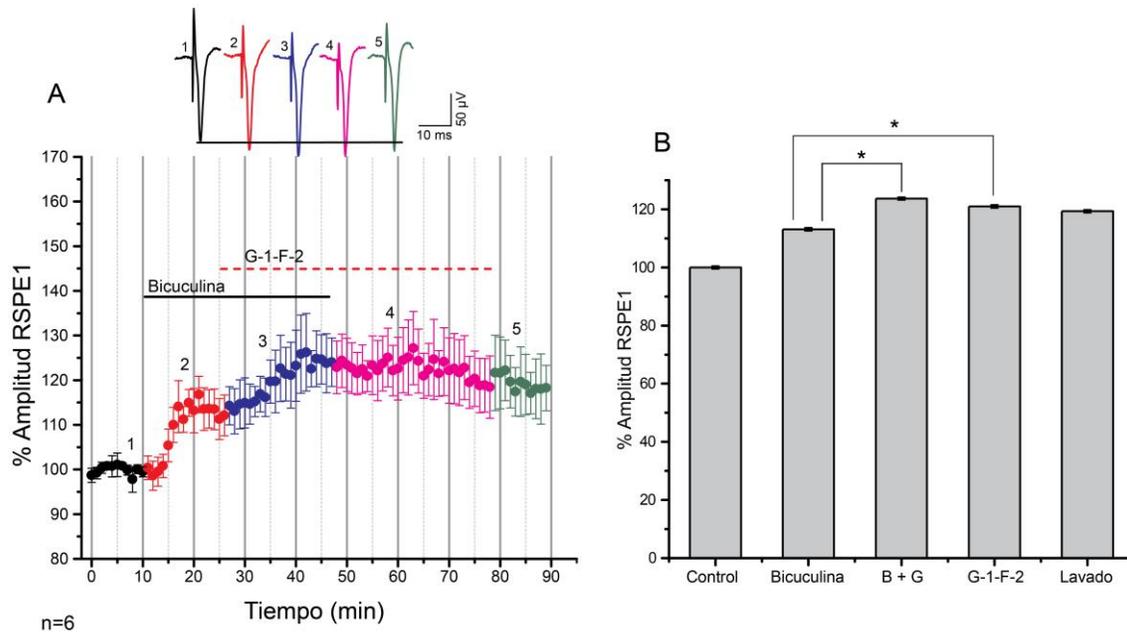
Los resultados obtenidos demuestran que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2, no actúa sobre mecanismos de neurotransmisión GABAérgicos, particularmente sobre receptores GABA<sub>A</sub>, sino que más bien el efecto inducido por estas moléculas actúa sobre sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos. Y aunque estos resultados proporcionan evidencia que sugiere que el efecto inducido por las Galphimines se relaciona directamente con los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, se requiere de un desarrollo metodológico más minucioso para poder corroborar esta suposición.

Por su parte, los resultados de la relación de pulso pareado o PPR obtenidos, demostraron que el efecto inducido por la mezcla G-1-F-2, se encuentra modulado por mecanismos de tipo presinápticos.

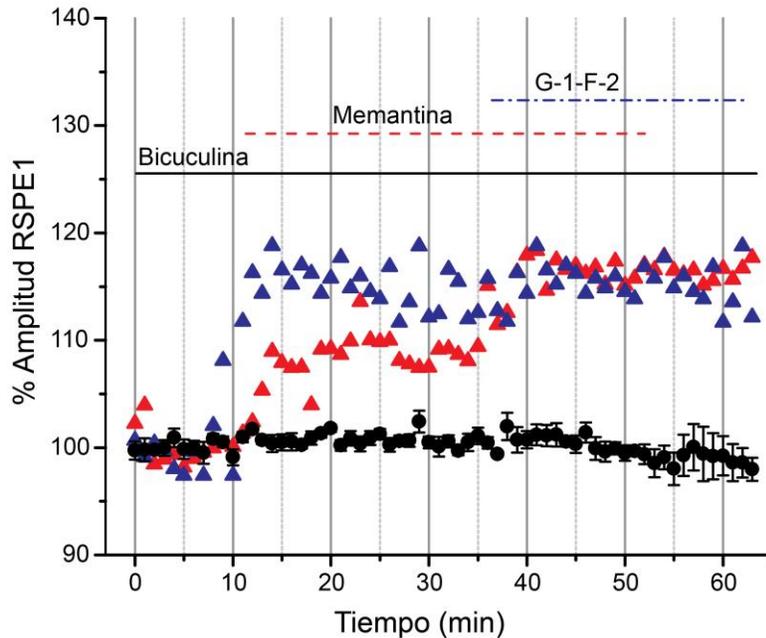
Finalmente, pese a que los resultados obtenidos proporcionan evidencia que ayuda a esclarecer los sistemas de neurotransmisión involucrados en el efecto modulador inducido por las Galphimines, no contamos con datos suficientes como para determinar de manera precisa el mecanismo de acción de estas moléculas.

## 11.- Anexo uno

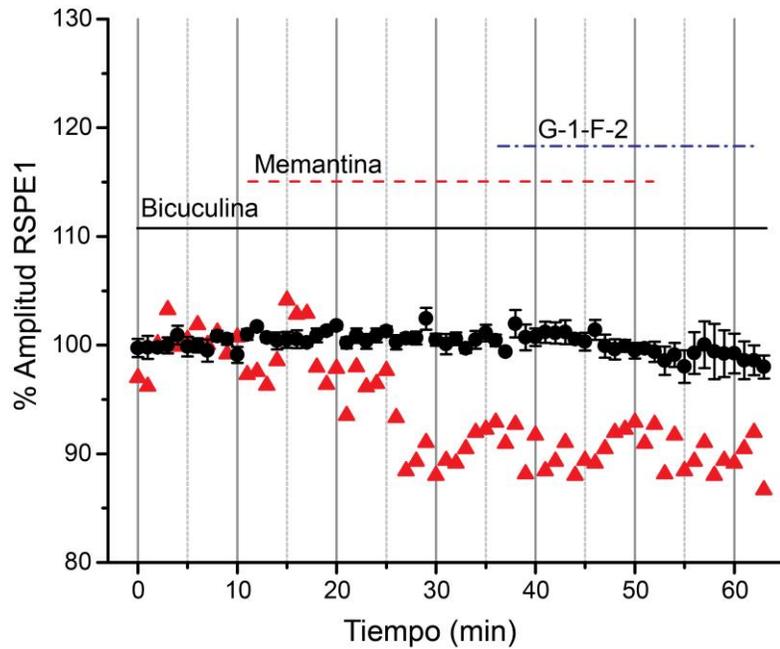
### Figuras suplementarias



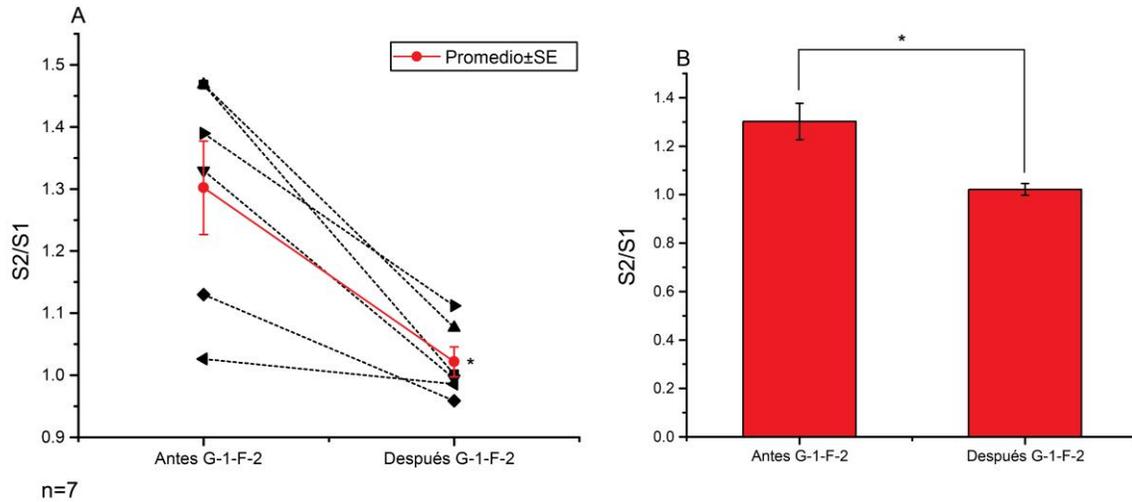
**Figura suplementaria 1. Efecto de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Bicuculina.-** Donde RSPE1= Respuesta Sináptica Poblacional Evocada ante el Primer Estímulo; B+G= efecto conjunto de Bicuculina+G-1-F-2, las diferencias significativas entre los grupos evaluados se muestran con un asterisco. En A se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RSPE1 registrada durante el curso temporal (10 min de control; 15 min con Bicuculina; 20 min de efecto conjunto B+G; 30 min con G-1-F-2 y 10 min de lavado), así como insertos en la parte superior, se muestran trazos representativos del curso temporal registrado donde los números indican la parte del curso representado. Por otra parte, en B se muestran los cambios en la amplitud de la RSPE1 registrados durante las diferentes condiciones evaluadas en el curso temporal. (n=6; Prom±SE).



**Figura suplementaria 2. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA.** Donde RSPE1= Respuesta Sináptica Poblacional Evocada ante el Primer Estímulo; en los círculos negros se expresa el promedio $\pm$ SE de la tendencia del comportamiento de los datos que representan el 66% (n=6) de los registros realizados, mientras que los triángulos azules y rojos representan el comportamiento del 22% (n=2) de los registros. Se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RSPE1 registrada durante un curso temporal (consistió en el registro de 10 minutos del efecto de Bicuculina, 25min del efecto conjunto Bicuculina+Memantina; 15min del efecto conjunto Bicuculina+Memantina+G-1-f-2 y 10 minutos de efecto Bicuculina+G-1-F-2), en donde se puede apreciar que en el 22% de los experimentos al agregar 10 $\mu$ M de Memantina al medio, este fármaco induce un incremento sobre la amplitud de la respuesta sináptica poblacional de aproximadamente un 15%, mientras que al agregar la mezcla G-1-F-2 al medio, esta parece no inducir variaciones sobre la amplitud de la RSPE1 registrada.



**Figura suplementaria 3. Efecto de la mezcla G-1-F-2 sobre poblaciones neuronales estriatales, en presencia de un antagonista de los receptores NMDA.** Donde RSPE1= Respuesta Sináptica Poblacional Evocada ante el Primer Estímulo; en los círculos negros se expresa el promedio±SE de la tendencia del comportamiento de los datos que representan el 66% (n=6) de los registros realizados, mientras que los triángulos rojos representan el comportamiento del 11% (n=1) de los registros. Se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RSPE1 registrada durante un curso temporal (consistió en el registro de 10 minutos del efecto de Bicuculina, 25min del efecto conjunto Bicuculina+Memantina; 15min del efecto conjunto Bicuculina+Memantina+G-1-F-2 y 10 minutos de efecto Bicuculina+G-1-F-2), en donde se puede apreciar que en el 11% de los experimentos al agregar 10µM de Memantina al medio, este fármaco induce un decremento sobre la amplitud de la respuesta sináptica poblacional de aproximadamente un 10%, mientras que al agregar la mezcla G-1-F-2 al medio, esta parece no inducir variaciones sobre la amplitud de la RSPE1 registrada.



**Figura suplementaria 4. Relación de pulso parado (PPR) antes y después de la aplicación de G-1-F-2.-** Donde cada uno de los símbolos con línea punteada representa un experimento realizado, mientras que, la línea roja continua representa el promedio de estos, las diferencias significativas entre las condiciones evaluadas se muestran con asterisco.- En A se observa la relación S2/S1 de la respuesta sináptica registrada, antes y después de la aplicación de la mezcla G-1-F-2, por su parte, en B se muestra una gráfica representativa de esta relación, en donde se observa de mejor manera las diferencias significativas en el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de la mezcla G-1-F-2 (n=7; Prom±SE).

## 12.- Anexo dos

### Análisis estadístico

#### Curva concentración-respuesta Diazepam

Description	Nonlinear Curve Fit
Username	Laboratorio6
Operation Time	10/06/2022 10:31:12
Iteration Algorithm	Levenberg Marquardt
Model	DoseResp
Number of Parameters	4
Number of Derived Parameters	4
Number of Datasets	6
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$
Report Status	Report generated from Data Changed
Special Input Handling	
Data Filter	No
Multi-Data Fit Mode	Global Fit

Model DoseResp			
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$		
Reduced Chi-Sqr	2.07E-04		
Adj. R-Square	0.9426488		
		Value	Standard Error
curva1	A1*	2.01926892	0
curva1	A2*	2.15611844	0
curva1	LOGx0	8.92660517	1.31709127
curva1	p	0.13286476	0.05506267
curva1	span	0.13684952	0
curva1	EC20	24844.512	127954.467
curva1	EC50	844510717	2561160080
curva1	EC80	2.8706E+13	1.5529E+14
curva2	A1*	2.01926892	0
curva2	A2*	2.15611844	0
curva2	LOGx0	10.0921407	34162.581

curva2	p	0.85841014	318268.704
curva2	span	0.13684952	0
curva2	EC20	2459089643	1.28E+15
curva2	EC50	1.2363E+10	9.7254E+14
curva2	EC80	6.2159E+10	4.21E+16
curva3	A1*	2.01926892	0
curva3	A2*	2.15611844	0
curva3	LOGx0	10.6014622	6.71803596
curva3	p	0.02871636	0.02433505
curva3	span	0.13684952	0
curva3	EC20	4.32E-11	1.29E-09
curva3	EC50	3.9945E+10	6.179E+11
curva3	EC80	3.69E+31	2.00E+33
curva4	A1*	2.01926892	0
curva4	A2*	2.15611844	0
curva4	LOGx0	10.2771136	27253.2123
curva4	p	0.77468735	76187.9564
curva4	span	0.13684952	0
curva4	EC20	3161902481	3.5805E+14
curva4	EC50	1.8928E+10	1.19E+15
curva4	EC80	1.1331E+11	2.71E+16
curva5	A1*	2.01926892	0
curva5	A2*	2.15611844	0
curva5	LOGx0	10.1416321	0.15704013
curva5	p	1.19078	0.01867845
curva5	span	0.13684952	0
curva5	EC20	4325444731	1643061813
curva5	EC50	1.3856E+10	5010239168
curva5	EC80	4.4385E+10	1.5239E+10
Mean	A1*	2.01926892	0
Mean	A2*	2.15611844	0
Mean	LOGx0	10.5331154	1.60199517
Mean	p	0.1230937	0.06766799
Mean	span	0.13684952	0
Mean	EC20	438575.995	2451868.62
Mean	EC50	3.4128E+10	1.2589E+11
Mean	EC80	2.66E+15	2.26E+16

## Comparación del porcentaje de amplitud de a RSPE1 del efecto de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Diazepam

miércoles, julio 13, 2022, 08:11:53 p. m.

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

**Data source:** Diazepam D+G in Diazepam

**Normality Test (Kolmogorov-Smirnov)** Passed (P = 0.415)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	11	0	99.983	99.647	101.182
Diazepam	21	0	106.322	104.642	108.839
D+"G-1-F-2"	16	0	123.142	120.502	126.589

- H = 40.776 with 2 degrees of freedom. (P = <0.001)
- The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)
- To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method):

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
D+G-1-F-2 vs Control	34.500	6.292	Yes
D+G-1-F-2 vs Diazepam	18.500	3.982	Yes
Diazepam vs Control	16.000	3.071	Yes

## Relación de pulso pareado antes y después de la administración de Diazepam

**Paired t-test:**

miércoles, julio 13, 2022, 08:18:19 p. m.

**Data source:** PPR in Diazepam

**Normality Test (Kolmogorov-Smirnov)** Passed (P = 0.444)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Control	7	0	1.015	0.0513	0.0194
Diazepam	7	0	0.969	0.0667	0.0252
Difference	7	0	0.0464	0.0372	0.0141

- $t = 3.298$  with 6 degrees of freedom. ( $P = 0.016$ )
- 95 percent confidence interval for difference of means: 0.0120 to 0.0808
- The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change ( $P = 0.016$ )
- Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.752

## Relación de pulso pareado antes y después de la administración de la mezcla G-1-F-2

**Paired t-test:**

miércoles, julio 13, 2022, 08:18:44 p. m.

**Data source:** PPR in Diazepam

**Normality Test (Kolmogorov-Smirnov)** Passed ( $P = 0.321$ )

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Diazepam	7	0	0.969	0.0667	0.0252
D+"G-1-F-2"	7	0	0.901	0.0616	0.0233
Difference	7	0	0.0680	0.0382	0.0144

- $t = 4.713$  with 6 degrees of freedom. ( $P = 0.003$ )
- 95 percent confidence interval for difference of means: 0.0327 to 0.103
- The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change ( $P = 0.003$ )
- Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.972

## Comparación del porcentaje de amplitud de la RSPE1 del efecto de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Memantina

lunes, junio 20, 2022, 01:13:39 p. m

**Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**

**Data source:** Memantina+G-1-F-2 in Memantina

**Normality Test (Kolmogorov-Smirnov)** Passed ( $P = 0.213$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0.171$ )

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Bicuculina	246	235	99.859	99.736	100.532

Memantina	26	0	100.599	100.379	101.009
M+G	16	0	100.435	99.627	101.168
B+G	11	0	99.088	98.553	99.272

- $H = 29.266$  with 3 degrees of freedom. ( $P = <0.001$ )
- The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ )
- To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method):

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
Memantina vs B+G	35.231	5.261	No
Memantina vs Bicuculina	16.503	2.464	No
Memantina vs M+G	7.356	1.243	Do Not Test
M+G vs B+G	27.875	3.822	No
M+G vs Bicuculina	9.148	1.254	Do Not Test
Bicuculina vs B+G	18.727	2.359	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

## Relación de pulso pareado antes y después de la administración de Memantina en presencia de Bicuculina

**Wilcoxon Signed Rank Test**

martes, enero 31, 2023, 11:43:30 p. m.

**Data source:** PPR in memantina

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed ( $P = 0.856$ )

**Paired t-test:**

martes, enero 31, 2023, 11:43:30 p. m.

**Data source:** PPR in memantina

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Bicuculina	6	0	1.078	0.126	0.0513
B+Memantina	6	0	1.035	0.107	0.0438
Difference	6	0	0.0432	0.0323	0.0132

$t = 3.268$  with 5 degrees of freedom. ( $P = 0.022$ )

95 percent confidence interval for difference of means: 0.00921 to 0.0771

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.022)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.707

## Relación de pulso pareado antes y después de la administración de la mezcla G-1-F-2 en presencia de Bicuculina+Memantina

**Wilcoxon Signed Rank Test**

martes, enero 31, 2023, 11:44:02 p. m.

**Data source:** PPR in memantina

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.232)

**Paired t-test:**

martes, enero 31, 2023, 11:44:02 p. m.

**Data source:** PPR in memantina

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
B+Memantina6	0	1.035	0.107	0.0438	
B+M+G 6	0	1.001	0.0683	0.0279	
Difference	6	0	0.0342	0.0587	0.0240

t = 1.427 with 5 degrees of freedom. (P = 0.213)

95 percent confidence interval for difference of means: -0.0274 to 0.0958

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.213)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.129

The power of the performed test (0.129) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

## Relación de pulso pareado antes y después de suspender la administración de Memantina

**Wilcoxon Signed Rank Test**

martes, enero 31, 2023, 11:44:45 p. m.

**Data source:** PPR in memantina

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
B+M+G	6	0	0.968	0.958	1.056
B+G	6	0	0.965	0.949	1.004

W= -17.000 T+ = 2.000 T- = -19.000  
Z-Statistic (based on positive ranks) = -1.782  
P(est.)= 0.093 P(exact)= 0.094

The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that it is due to chance (P = 0.094)

**Paired t-test:**

martes, enero 31, 2023, 11:44:45 p. m.

**Data source:** PPR in Memantina

**Normality Test (Kolmogorov-Smirnov)** Failed (P < 0.050)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
B+M+G	6	0	1.001	0.0683	0.0279
B+G	6	0	0.973	0.0289	0.0118
Difference	6	0	0.0282	0.0496	0.0203

- t = 1.391 with 5 degrees of freedom. (P = 0.223)
- 95 percent confidence interval for difference of means: -0.0239 to 0.0802
- The change that occurred with the treatment is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to chance (P = 0.223)
- Power of performed test with alpha = 0.050: 0.121
- The power of the performed test (0.121) is below the desired power of 0.800.
- Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

### 13.- Referencias bibliográficas

- Abarca-Vargas, R., Zamilpa, A., Alarcón, A, F., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., y Jiménez-Ferrer, E. (2014). Pharmacokinetic study in mice of Galphimine-A, an anxiolytic compound from *Galphimia glauca*. *Molecules*, 19(3), 3120-3134.
- Afifi, k, A. & Bergman, A, R. (2006). Neuroanatomía funcional: texto y atlas (Segunda edición). México. McGraw-Hill Interamericana.
- Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Jiménez, J. E., Alonso-Cortés, D., Cortés-Gutiérrez, E., Ledesma, N., y Tortoriello, J. (2007). Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 35–40.
- Álvarez-González, E., Álvarez-González, L., Macías-González, R., y Pavón-Fuentes, N. (2001). Conceptos actuales sobre la función de los ganglios basales y el papel del núcleo subtalámico (NST) en trastornos del movimiento. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 2(2), 77-85.
- Andrews, R, P. & Johnston, R, A, G. (1979). GABA agonists and antagonists. *Biochemical Pharmacology*, 28(18), 2697-2702.
- Ávila-Uribe, M, M., García-Zarate, N, S., Sepúlveda-Barrera, S, A., y Godínez-Rodríguez, A, M. (2016). Medicinal plants in two towns of the San Martin de las piramides municipality, state of México. *Polibotánica*, 42, 215-245.
- Avilés-Montes, D., Herrera-Ruiz, M., Román-Ramos, R., Jiménez-Ferrer, E., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., y Tortoriello, J. (2015). Pharmacological interaction between Galphimine-A, a natural anxiolytic compound and gabaergic drugs. *International Journal of Pharmacology*, 11(8), 944–955.
- Avilés-Montes, Dante. (2015). Interacción de Galphimina-A con los sistemas GABAérgicos y Glutamatérgicos, en modelos de ansiedad y electrofisiología de la amígdala basolateral. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México D.F.
- Balari, S. & Lorenzo, G. (2009). Computational phenotypes: were the theory of computation meets Evo–Devo. *biolinguistics*, 3(1), 2–60.

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana<sup>A</sup>, UNAM. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/index.html> el día 16/mayo/2022.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana<sup>B</sup>, UNAM. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=gaulphimia-glauca> el día 21/abril/2022.
- Bolam, P, J., Brown, C, T, M., Moss, J., y Magill, J, P. (2009). Basal ganglia: internal organization. *Encyclopedia of Neuroscience*, 2, 97-104.
- Bolam, P, L., Hanley, J, J., Booth, C, A, P., y Bevan, D, M. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196(4), 527-542.
- Bretschneider, F. & De Weille, R, J. (2006). Chapter 3 Electrochemistry (103-131), in, *Introduction to electrophysiological methods and instrumentation*. Elsevier.
- Brunton, I., Lazo, J., y Parker, K. (2007). *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica (Undécima edición)*. Colombia. McGRAW-HILL Interamericana. 429-459.
- Cardoso-Takeda, T, A., Lozada-Lechuga, J., Fragoso-Serrano, M., Villarreal, L, M., y Pereda-Miranda, R. (2004). Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Natural Products*, 67(4), 644-649.
- Cardoso-Takeda, T, A., Pereda-Miranda, R., Hae-Choi, Y., Verpoorte, R., y Villarreal, L, M. (2008). Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Planta Medica*, 74(10), 1295–1301.
- Challenger, A. & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres, capital natural de México, Vol. I: conocimiento actual de la biodiversidad, 1, 87–108.
- Chen, V, H, S. & Lipton, A, L. (2005). Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-Methyl-D-aspartate-Gated Channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 961-971.

- Chen, V, H, S. & Lipton, A, S. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1611–1626.
- Chen, V, H, S., Pellegrini, W, J., Aggatwal, S, J., Sizheng, I., Warach L., Jensen, F, E., y Lipton, S, A. (1992). Open-channel block of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor mediated neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 72(11), 4427-4436.
- Colino, A., Muños, J., y Vara, H. (2002). Plasticidad sináptica a corto plazo. *Revista de Neurología*, 34(6), 593-599.
- CONABIO: biodiversidad mexicana (2020). Recuperado de <https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees> el día 21/abril/2022.
- Crittenden, R, J. & Graybiel, M, A. (2011). Basal ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(59), 1-25.
- Do, J., Kim, J, I., Bakes, J., Lee, K., y Kaang B, K. (2013). Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. *Learning & Memory*, 20(1), 21-28.
- Drexler, B., Zinser, s., Hentschke, H., y Antkowiak, B. (2010). Diazepam decreases action potential firing of neocortical neurons via two distinct mechanisms. *Anesthesia & Analgesia*, 111(6):1394-1399.
- Fanjul de Moles, M, L. & Hiriart, Urdanivia, M. (Eds). (2008). *Biología funcional de los animales II. Una neurofisiología comparada (Segunda edición)*. México D.F. Siglo XXI. 117-121.
- Frankiewicz, T., Potier, B., Bashir, Z, I., Collingridge, G, L., y Parsons, C, G. (1996). Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurones and on synaptic transmission and LTP in area CA1 of rat hippocampal slices. *British Journal of Pharmacology*, 117(4), 689-697.
- Garcia-Munoz, M., Lopez-Huerta, G, V., Carrillo-Reid., y Arbuthnott, W, G. (2015). Extrasynaptic glutamate NMDA receptors: key players in striatal function. *Neuropharmacology*, 89(1), 54-63.

- Garinge, R, S, B., Keshetti, S., y Vattikuti, R, M, U. (2016). *In vivo* study on depressant effects and muscle coordination activity of *Galphimia glauca* stem methanol extract. *Pharmacognosy Research*, 8(4): 219–225.
- Gerfen, R, C. & Surmeier, J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 441–466.
- Gómez-Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México/Medicinal plants in a small village in the state of Tabasco México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 43–49.
- Gómez-Pineda, V, G., Torres-Cruz, F, M., Vivar-Cortés, I, C., y Hernández-Hecheagaray, E. (2018). Neurotrophin-3 restores synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of Huntington’s disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 24(4):353-363
- González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Marquina, S., Álvarez, L., y Tortoriello, J. (2014). Anti-inflammatory activity and chemical profile of *Galphimia glauca*. *Planta Medica*, 80(1), 90–96.
- Guzmán, G, L., Reyes, C, R., y Bonilla, J, H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety and depression in Mexican traditional medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 591-608.
- Hansen, B, H., Wollmuth, P, L., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, S, F., Sobolevsky, I, A., Swanson, T, G., Swanger, A, S., Greger, H, I., Nakagawa, T., McBain, J, C., Jayaraman, V., Low, C, M., Dell’Acqua, L, M., Diamond, S, J., Camp, R, C., Perszyk, E, C., Yuan, H., y Traynelis, S. (2021). Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 73(4), 1469–1658.
- HAUBER, WOLFGANG. (1998). Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in Neurobiology*, 56(5), 507-540.
- Herrera-Arellano, A., Jiménez-Ferrer, J., Zamilpa, A., García-Alonso, G., Herrera-Álvarez, S., y Tortoriello, J. (2012). Therapeutic effectiveness of *Galphimia glauca* vs. lorazepam in generalized anxiety disorder, a controlled 15-week clinical trial. *Planta Medica*, 78(14), 1529–1535.

- Herrera-Arellano, A., Jiménez-Ferrer, J., Zamilpa, A., Morales-Valdéz, M., García-Valencia, C., y Tortoriello, J. (2007). Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder, a randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Planta Medica*, 73(8), 713-717.
- Herrera-Ruiz<sup>1</sup>, M., Jiménez-Ferrer, E, J., De Lima, M, C, T., Avilés-montes, D., Pérez-García, D., González-Cortazar, M., y Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine*, 13(1-2), 23-8.
- Herrera-Ruiz<sup>2</sup>, M., González-Cortázar, M., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Alvares, L., Ramírez, G., y Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic effect of natural galphimines from *Galphimia glauca* and their chemical. *Journal of Natural Products*, 69(1), 59-61.
- Herrero, T, M., Luquin, M, R., Vicente de Pabos, M., y Villalba, F, E. “Capitulo.1. Anatomía química de los ganglios basales. La transmisión dinámica”. En Micheli, E, F., Luquin, Pulido, R, M. (2012). *Movimientos anormales, clínica y terapéutica*. España, Medica Panamericana.
- Holland, Z, L. (2015). The origin and evolution of chordate nervous systems. *Philosophical Transactions The Royal society*, 370, 8.
- INEGI. (2016). Estadísticas a propósito del día internacional de los pueblos indígenas. Recuperado de [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/indigenas2016\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/indigenas2016_0.pdf) el día 15/julio/2022.
- Jiménez-Ferrer, E., Herrera-Ruiz, M., Ramírez-García, R., Herrera-Arellano, A., y Tortoriello, J. (2011). Interaction of the natural anxiolytic Galphimine-B with serotonergic drugs on dorsal hippocampus in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 724-729.
- Johnson, W, J. & kotermanski, E, S. (2006). Mechanism of action of memantine. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 61-7.

- Johnston, D & Miao-Sin, W, S. (1995). Cap 13, Synaptic transmission III: postsynaptic mechanisms (392-395), in, Foundations of cellular neurophysiology. Cambridge: MIT press.
- Johnston, R, A, G. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. British Journal of Pharmacology, 169(2), 328–336.
- Katz, B. & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. Journal of Physiology, 195(2), 481-492.
- Kawaguchi, Yasuo. (1997). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. Neuroscience Research, 27(1), 1-8.
- Korol, S, V., Jin, Z., y Birnir, B. (2015). The GLP-1 receptor agonist exendin-4 and diazepam differentially regulate GABAA receptor-mediated tonic currents in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. Plos One, 10(4), 2-8.
- Kreitzer, C, A. & Malenka, C, R. (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. Neuron, 60(4), 543–554.
- Lanciego, L, J., Luquin, N., y Obeso, A, J. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(12), 1-20.
- Langley, L, L., Telford, R., y Christensen, B, J. (1981). Anatomía y Fisiología (Cuarta edición). México D.F. Interamericana.
- Lara-Ochoa, F., Guillén-Torres, A., Espinosa-Pérez, G., y Ortega-Hernández, A. (2005). Conformational study of galphimines A and B, spectrochimica acta - part A: molecular and biomolecular. Spectroscopy, 61(11–12), 2677–2686.
- Lee, F, J, S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, T, Y., Niznik, B, H., Yu, X, M., y Liu, F. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. Cell, 111(2), 219-230.
- León, Álvarez, Eleazar. (2018). Aislamiento de nor-triterpenos bioactivos de una población de *Galphimia glauca Cav.* (Malpighiaceae) colectada en Tepoztlán, Morelos”, Tesis que para obtener el grado de Maestra en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, centro de investigación en biotecnología, Cuernavaca Morelos, México.

- Lewis, G, J, S., Caldwell, A., y Barker, A, R. (2003). Modern therapeutic approaches in parkinson´s disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(10), 1-20.
- Li, F. & Tsien, Z, J. (2009). Memory and the NMDA receptors. *The New England Journal of Medicine*, 361(3), 302-303.
- Lorenz-Guertin, M, J., Bambino, J, M., Das, S, Weintraub, T, S., y Jacob, C, T. (2019). Diazepam accelerates GABA<sub>A</sub> synaptic exchange and alters intracellular trafficking. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(163).
- Mamo, Dwayne. (2022). El mundo indígena. (Trigésima sexta edición). Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Iwgia.
- Masiulis, S., desai, R., uchanski, T., Martin, S, I., Lavery, D., Karia, D., malinauskas, T., Zivanov, J., Pardon, e., Kotecha, A., Steyaert, J., Miller, W, K., y Aricescu, R. (2019). GABA<sub>A</sub> receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*, 565(7740), 454–459.
- Mendoza, Duarte, E. (2001). Modulación presináptica de las aferentes glutamatergicas neocorticales por la activación de receptores a opiáceos  $\mu$  Y  $\delta$ . Tesis para obtener el título de Biólogo. Escuela Nacional de estudios Profesionales Campus Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Mendoza, E., Miranda-Barrientos, J. A., Vázquez-Roque, R. A., Morales-Herrera, E., Ruelas, A., De la Rosa, G., Flores, G., y Hernández-Echeagaray, E. (2014). In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience*, 280(1), 156–170.
- Morán, Martínez, I. (2013). Participación de las neurotrofinas BDNF y NT-4/5 en la modulación de la comunicación sináptica cortico-estriatal. Tesis que para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México.
- Newland, F, C. & Cull-Candy, G, S. (1992). On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *Journal of Physiology*, 447, 191-213.

- Nieuwenhuys, R., Voogd, J., y Van-Huizen, C. (2009). El sistema nervioso central humano. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
- Obeso, A, J., Rodríguez-Oroz, C, M., Benitez-Temino, B., Blesa, J, F., Guridi, J., Marin, C., y Rodriguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for parkinson's disease. *Movement Disorders*, 23(3), 548–559.
- Olsen, W, R. (2006). Picrotoxin-like channel blockers of GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A*, 103(16):6081-6082.
- Olsen, W, R. (2018). GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*, 136(Pt A), 10–22.
- Ortiz-Caltempa, A. (2008). Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimia glauca* en suspensión para la producción de triterpenos, Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias en desarrollo de productos bióticos. Centro de desarrollo de productos bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec Morelos, México.
- Ospina-García, N., Pérez-Lohman, C., Vargas-Jaramillo, J, D., Cervantes-Arriaga, A., y Rodríguez-Violante, M. (2017). Ganglios basales y conducta. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(6), 74-86.
- Parent, A. & Hazrati, L, N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*, 20(1), 91-127.
- Parsons, C, G., Gruner, R., Rozental, J., Millar, J., y Lodge, D. (1993). Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of n-methyl-d-aspartate receptor antagonism by memantine (l-amino-3,5dimethyladamantan). *Neuropharmacology*, 32(12), 1337-1350.
- Parsons, C, G., Panchenko, V, A., Pinchenko, V., Tsyndrenko, A, Y., y Krishta, O, A. (1996). Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine. *European Journal of Neuroscience*, 8(3), 446-454.

- Parsons, G. C., Gilling, E. K., y Jatzke, C. (2008). Memantine does not show intracellular block of the NMDA receptor channel. *European Journal of Pharmacology*, 587(1-3), 99-103.
- Pérez, O. G., & González, M., (2015). Plantas medicinales contra la ansiedad. *Ciencia*, julio-septiembre 2015, 53-307.
- Prieto-Gómez, B., Tortoriello, J., Vázquez-Alvarez, A., y Reyes-Vázquez, C. (2003). Galphimine B modulates synaptic transmission on dopaminergic ventral tegmental area neurons. *Planta Medica*, 69(1), 38-43.
- Purves, D., Augustine, J. G., Fitzpatrick, D., Hall, C. W., LaMantia, Anthony-Samuel., y White, E. L. (2015). *Neurociencias* (Quinta edición). España. Medica Panamericana.
- Quiroz, Gutiérrez, F. (2012). *Tratado de anatomía humana, tomo II* (Cuadragésima tercera edición). México. Editorial Porrúa.
- Ramakrishnan, L. & Hess, P. G. (2005). Picrotoxin inhibition mechanism of a  $\gamma$ -aminobutyric Acid receptor investigated by a laser-pulse photolysis technique. *Biochemistry*, 44(23), 8523-8532.
- Romero-Cerecero, O., Islas-Garduño, L. A., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Jiménez-Ferrer, E., y Tortoriello, J. (2019). Galphimine-B standardized extract versus alprazolam in patients with generalized anxiety disorder: a ten-week, double-blind, randomized clinical trial. *Biomed Research International*, 30.
- Santillán-Urquiza, M. A., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Román-Ramos, R., y Tortoriello, J. (2018). Pharmacological interaction of *Galphimia glauca* extract and natural galphimines with ketamine and haloperidol on different behavioral tests. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 879-888.
- Schlaepfer, L. & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México/Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18–27.
- Sharma, A., Angulo-Bejarano, P. I., Madariaga-Navarrete, A., Oza, G., Iqbal, N., M. H., Cardoso-Taketa, A., y Villarreal, L. M. (2018). Multidisciplinary

investigations on *Galphimia glauca*: a Mexican medicinal plant with pharmacological potential. *Molecules*, 23(11), 1-22.

- SIC México; Sistema de Información de Cultura. Recuperado de [https://sic.cultura.gob.mx/index.php?table=grupo\\_etnico#](https://sic.cultura.gob.mx/index.php?table=grupo_etnico#) El día 15/junio/2022.
- Silva-Pereyra, Juan. (2011). Métodos en neurociencias cognoscitivas. México. Editorial El Manual Moderno. 2-19.
- Smith, Y., Bevan, D, M., Shink, E., y Bolam, P, J. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86(2), 353–387.
- Snell, S, R. (2006). Neuroanatomía clínica (Sexta edición). Buenos Aires. Medica Panamericana.
- Sousa, M, M, A., Meyer, A, K., Santpere, G., Gulden, O, F., y Sestan, N. (2017). Evolution of the human nervous system function, structure, and development. *Cell*, 170(2), 226-247.
- Tepper, J. M. & Plenz, D. (2006). Microcircuits in the striatum: striatal cell types and their interaction. En Grillner, S. & Graybiel, M, A. Microcircuits: The interface between neurons and global brain function, Dahlem Workshop Report 93. (127-135). Cambridge, MA, The MIT Press.
- Tisch, S., Silberstein, P., Limousin-Dowsey, P., y Jahanshahi, M. (2004). The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *The Psychiatric Clinics of North America*, 27(4), 757-799.
- Torres-Cruz, F, M., Vivar-Cortés, I, C., Moran, I., Mendoza, E., Gómez-Pineda, V., García-Sierra, F., y Hernández-Echeagaray, E. (2019). NT-4/5 antagonizes the BDNF modulation of corticostriatal transmission: role of the TrkB.T1 receptor. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(5), 621-631.
- Tortoriello, J. & Lozoya, X. (1992). Effect of *Galphimia glauca* methanolic extract on neuropharmacological tests. *Planta Medica*, 58(3), 234–236.
- Tortoriello, J. & Ortega, A. (1993). Sedative effect of Galphimine-B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. *Planta Medica*, 59(5), 398-400.
- Tortoriello, J. (1991). Estudio fitoquímico y farmacológico de *Galphimia glauca* Cav. Tesis que para la obtención del grado Maestría en ciencias. Facultad de

Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Xochitepec, Morelos, México.

- Tortoriello, J., Herrera-arellano, A., Herrera-ruiz, M. L., Rojas-bribiesca, G., y Zamilpa, A. (2006). Aplicación clínica de un ansiolítico obtenido de *Galphimia glauca*. *Revista de Fitoterapia*, 6(1), 1–4.
- Tortoriello, J., Herrera-Arellano, A., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., González, M., y Jiménez-Ferrer, E. (2011). New anxiolytic phytopharmaceutical elaborated with the standardized extract of *Galphimia glauca*. *Planta Medica*, 78(11).
- Tortoriello, J., Ortega, A., Herrera-Ruiz, M., Trujillo, J., y Reyes-Vázquez, C. (1998). Galphimine-B modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats. *Planta Medica*, 64(4), 309-313.
- Toscano, A., Ortega, A., Maldonado, E., Gaviño, R., Lozoya, X., y Tortoriello, J. (1993). Structure of Galphimine-B. *Acta Crystallographica Section C*, 49(4), 774–776.
- Traynelis, F, S., Wollmuth, P, L., McBain, J, C., Menniti, S, F., Vance, M, K., Ogden, K, K., Hansen, B, K., Yuan, H., Myers, J, S., y Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496.
- Waldman, S. & Terzic, A. (2010). *Farmacología y terapéutica: principios para la práctica*. México. Editorial El Manual Moderno. 96-107.
- Waxman, G, S. (2011). *Neuroanatomía clínica (Vigésimo sexta edición)*. México D.F. McGraw-Hill.
- Xia, P., Huei-sheng, V, C., Dongxian, Z., y Lipton, A, S. (2010). Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *The Journal of Neuroscience*. 30(33), 11246 –11250.
- Yamada, K., Takahashi, S., Karube, F., Fujiyama, F., Kobayashi, K., Nishi, A., y Momiyama, T. (2016). Neuronal circuits and physiological roles of the basal ganglia in terms of transmitters, receptors and related disorders. *Journal of Physiological Sciences*, 66(6), 435–446.
- Yin, H, H. & Knowlton, J, B. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 464-76.

- Zell, H. (2009). Recuperado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Galphimia\\_glauca\\_003.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Galphimia_glauca_003.JPG) el día 28/septiembre/2022.