



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

TÍTULO DE LA TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
NEUROPROTECTORA Y  
ELECTROCORTICOGRÁFICA DE *SALVIA*  
*CIRCINNATA* CAV. EN LAS CRISIS  
INDUCIDAS POR PENTILENTETRAZOL EN  
RATONES

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS

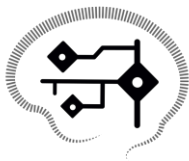
PRESENTA:

NOMBRE DEL ALUMNO  
RODRIGO MENDOZA MADRIGAL

TUTOR(A)

DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

Cd. Mx. Facultad de Medicina, 2024



NEUROCIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

Agradezco al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” por los recursos proporcionados en los proyectos NC123280.0 y NC123240.1.

## Dedicatoria

Ha llegado el día de concluir este capítulo de mi vida y, aunque me es difícil expresar en palabras los sentimientos que me llenan, si puedo intentar dar presencia y expresar al menos uno de ellos, es agradecimiento. Por todas las personas que han estado en este camino y que sin ellas absolutamente nada de esto hubiera sido posible.

A mis papás, por su apoyo y amor incondicional y por ser mi pilar sin el que darse por vencido hubiera sido más tentador en todos esos días de estrés y malhumor. Las palabras siempre serán insuficientes para agradecer todo lo que han hecho por mí, los amo.

A mi hermana, por ser mi ejemplo y mi guía que me impulsa a crecer día con día. Eres enorme Nat, te adoro, te amo y te admiro con el corazón.

A Lui, Pau y Joha por ser el mejor equipo, los mejores compañeros y amigos en la universidad y dentro y fuera de la carrera. Empezamos, caminamos y terminamos juntos.

A Rodrigo, José María y Enrique por siempre creer en mí y hacerme ver que la amistad puede durar toda una vida. Crecer todos los días junto a ustedes ha sido una bendición y me llena el corazón; he aprendido de ustedes más de lo que yo pudiera enseñarles en una vida.

A mi abuela Clemen, por ser de las mujeres más importantes de mi vida y amarme siempre tan inconmensurablemente y darme toda la confianza del mundo para ser yo. Eres fuente de inspiración Güeli y te llevo siempre conmigo esté donde esté.

A mi abuelo Beto, porque, aunque está en el cielo desde hace unos años, lo he llevado siempre en el corazón y en el espíritu de una vida sensacional. Tu visión siempre fue inspiradora y es por eso por lo que yo te recuerdo en cada sonrisa, en cada chiste, en cada carcajada y en cada momento sempiterno. Fuiste y siempre serás fantástico.

A mi abuela China, por su perenne cariño y apoyo que solo ha crecido con los años. Te quiero muchísimo, Abue.

A mi tía Guadalupe, por siempre tener un cachito de su corazón y mente enfocados imperecederamente en nosotros y su enorme capacidad para amar y dar.

A mis tíos, sobre todo Manchis y Tolito por sus sonrisas, dedicación e inefable afecto que me han impulsado durante todos estos años. De ustedes he aprendido a sonreír siempre desde el corazón. Los adoro.

A todo el Sicue, por mostrarme que se puede encontrar la familia en los lugares más inesperados e inspirarme todos los días para ser mejor. Viva Murcia.

A mis tutores, la Dra. Eva y el Dr. David y a todos mis compañeros del laboratorio, especialmente Dani y Jaz por sus enseñanzas, su paciencia y su apoyo en esta etapa tan importante. Gracias por todo.

A la UNAM, por brindarme la formación y la oportunidad de crecer personal y profesionalmente perteneciendo a la máxima casa de estudios.

A todas esas personas que han sido fuente de luz y han irradiado mi vida para llenarla de fulgor y ser. Sin ustedes hoy no sería quien soy. Eternas gracias.

## Índice de contenido

Listado de abreviaturas.....	6
Resumen .....	7
1. Marco Teórico .....	8
1.1 Epilepsia .....	8
1.1.1 Epidemiología.....	8
1.1.2 Definición .....	9
1.1.3 Clasificación de las crisis epilépticas y las epilepsias. ....	10
1.1.4 Diagnóstico de la epilepsia.....	14
1.1.5 Fármacos anticrisis (FACs).....	17
1.1.6 Modelos experimentales de epilepsia .....	20
1.2 Herbolaria con fines medicinales.....	23
1.2.1 Plantas medicinales con actividad anticonvulsiva .....	24
1.2.2 <i>Salvia circinnata</i> Cav. (Sinónimo <i>S. amarissima</i> Ortega) .....	25
2. Planteamiento del problema .....	26
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos .....	28
6. Protocolo experimental .....	29
6.1 Animales.....	29
6.2 Fármacos .....	29
6.3 Material vegetal .....	29
6.4 Colecta .....	29
6.5 Preparación del extracto.....	30
6.6 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	30
6.7 Cirugía e implante de electrodos .....	31
6.8 Diseño experimental.....	32
6.9 Análisis estadístico .....	34
7. Resultados.....	35
7.1 Preparación del extracto acuoso de la parte aérea de <i>S. circinnata</i> .....	35
7.2 Evaluación del perfil cromatográfico del extracto acuoso <i>S. circinnata</i> .....	35
7.3 Cirugía estereotáxica para el implante de electrodos .....	36

7.4 Evaluación del efecto del extracto acuoso de <i>S. circinnata</i> en los parámetros de latencia, incidencia, duración y supervivencia en las crisis clónicas y tónico-clónicas inducidas con PTZ en ratones. ....	37
7.5 Evaluación del perfil ECoG del extracto acuoso de <i>S. circinnata</i> .....	39
7.6 Evaluación del efecto de amarisolida A en la incidencia, latencia, duración y supervivencia en las crisis clónicas y tónico-clónicas en ratones. ....	44
7.7 Evaluación del perfil ECoG de amarisolida A. ....	45
7.8 Evaluación de la participación de los receptores inhibidores GABA <sub>A</sub> ó 5-HT <sub>1A</sub> de serotonina en la actividad anticonvulsiva y del perfil ECoG de amarisolida A. ....	47
8. Discusión .....	52
9. Conclusiones .....	55
10. Referencias.....	56

## Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Fármacos anticrisis de primera, segunda y tercera generación comúnmente usados en la terapéutica de la epilepsia .....	17
Figura 1. Clasificación de las epilepsias por tipo de crisis según la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) .....	12
Figura 2. Diferencias entre varios países respecto a la prevalencia, incidencia y brecha de tratamiento de la epilepsia .....	13
Figura 3. Diagrama esquemático de un equipo de electroencefalografía (EEG) .....	14
Figura 4. Diseño experimental .....	33
Figura 5. Características de las crisis inducidas con pentilentetrazol .....	34
Figura 6. Preparación del extracto acuoso de la parte aérea de <i>S. circinnata</i> Cav .....	35
Figura 7. Evaluación del perfil cromatográfico del extracto acuoso de <i>S. circinnata</i> .....	36
Figura 8. Realización de cirugías estereotáxicas para implantación de electrodos de registro electrocorticográfico (ECoG).....	37
Figura 9. Efectos de <i>S. circinnata</i> sobre la incidencia, latencia, duración y supervivencia en las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ.....	38
Figura 10. Cambios inducidos por el extracto acuoso de <i>S. circinnata</i> (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) sobre la potencia relativa de la corteza frontal del hemisferio derecho a los 15 y 30 min después de la administración de los tratamientos.....	40

Figura 11. Cambios inducidos por el extracto acuoso de <i>S. circinnata</i> (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) sobre la potencia relativa de la corteza parietal del hemisferio derecho 15 y 30 min después de la administración de los tratamientos .....	41
Figura 12. Comparación entre las diferentes dosis del extracto acuoso de <i>S.circinnata</i> del efecto sobre la potencia relativa .....	44
Figura 13. Efectos de amarisolida A sobre la incidencia, latencia, duración y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ en ratones.....	45
Figura 14. Cambios inducidos por el extracto acuoso de <i>S.circinnata</i> (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) y amarisolida A (1 mg/kg) sobre la potencia relativa de la cortezas frontal y parietal del hemisferio derecho 15 y 30 minutos tras la administración de los tratamientos .....	46
Figura 15. Cambios inducidos por el extracto acuoso de <i>S.circinnata</i> (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) y amarisolida A (1 mg/kg) sobre la potencia relativa de la cortezas frontal y parietal del hemisferio izquierdo 15 y 30 minutos tras la administración de los tratamientos .....	47
Figura 16. Efectos de amarisolida A en conjunto con PCT y WAY, sobre la incidencia, latencia, duración y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ en ratones .....	49
Figura 17. Comparación del efecto de amarisolida A en conjunto con PCT y WAY sobre la potencia relativa .....	51

### Listado de abreviaturas

- ILAE (Liga Internacional Contra la Epilepsia)
- vEEG (Video-electroencefalografía)
- EEG (Electroencefalografía)
- ECoG (Electrocorticografía)
- FACs (Fármacos anticrisis)
- SNC (Sistema nervioso central)
- PTZ (Pentilentetrazol)
- KA (Ácido kaínico)
- GABA (Ácido  $\gamma$ -aminobutírico)
- SW (Swiss-Webster)
- 8-OHDPAT (8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina)



- DZP (Diazepam)
- PCT (Picrotoxina)
- CCF (Cromatografía de capa fina)
- AcOEt (Acetato de etilo)
- CCA (Cromatografía en columna abierta)
- CLAR (Cromatografía líquida de alta resolución)
- UPLC (Cromatografía líquida Ultra-Performance)
- WAY (WAY-100135)
- ANADEVA (Análisis de varianza)

## **Resumen**

*Salvia circinnata* Cav. es una hierba nativa de México que ha sido usado en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones del sistema nervioso central (SNC), tal como los “nervios” (término de filiación cultural asociado con ansiedad) y el dolor, así como afecciones gastrointestinales y diabetes. A pesar de sus propiedades como depresor del SNC, no existe evidencia científica de sus efectos sobre el control de las crisis convulsivas. En este estudio, el objetivo principal fue investigar el efecto protector del extracto acuoso de *S. circinnata* y uno de sus metabolitos más abundantes, amarisolida A, ante las crisis convulsivas inducidas por un antagonista no competitivo del receptor GABA<sub>A</sub>, el pentilentetrazol. Asimismo, se buscó conocer el perfil electrocorticográfico del extracto y del metabolito para determinar su eficacia y posible mecanismo de acción anticonvulsivo. Para ello, ratones Swiss-Webster (SW) machos con cirugía estereotáxica para el implante de electrodos en las cortezas frontal y parietal fueron agrupados en  $n \geq 6$  para recibir el tratamiento de diferentes dosis del extracto (1, 3, 10, 30 ó 100 mg/kg, i.p.) o amarisolida A (0.5 ó 1 mg/kg), así como los fármacos de referencia diazepam y 8-hidroxi-2-

dipropilaminotetralina. Posteriormente se les indujo crisis convulsivas de tipo tónico-clónico con la administración de pentilentetrazol (85 mg/kg, i.p.). De igual manera, grupos independientes fueron administrados con el extracto en presencia de antagonistas de los receptores inhibidores GABA<sub>A</sub> y 5-HT<sub>1A</sub> para explorar su posible mecanismo de acción. El registro ECoG fue simultáneo a las conductas convulsivas para establecer los cambios en las bandas mediante el análisis de la potencia relativa. Tanto el extracto acuoso como la amarisolida A produjeron efecto anticonvulsivo significativo en las crisis tónico-clónicas, al reducir la incidencia y aumentar la latencia, así como favorecer la sobrevivencia. Ambos perfiles electrocorticográficos mostraron una disminución particular en las bandas de frecuencia alfa y beta. Sin embargo, a pesar de que los antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (picrotoxina) y 5-HT<sub>1A</sub> de serotonina (WAY100635) previnieron algunos cambios observados en las bandas de frecuencia en presencia de amarisolida A, no hubo significancia en la incidencia, latencia o sobrevivencia de las crisis tónico-clónicas. En conclusión, *S. circinnata* posee propiedades anticonvulsivas en parte debido a la presencia de amarisolida A, por lo que esta evidencia científica sugiere que ambos productos naturales podrían ser potenciales alternativas para el tratamiento de la epilepsia.

## **1. Marco Teórico**

### **1.1 Epilepsia**

#### **1.1.1 Epidemiología**

La epilepsia es una de las alteraciones cerebrales más severas y de mayor prevalencia en el mundo, afectando a más de 70 millones de personas. Esta enfermedad abarca un complejo de síntomas con múltiples factores de riesgo y una fuerte predisposición genética; su incidencia muestra que existe un mayor riesgo en niños y adultos mayores (Thijs et al., 2019).

El estimado de la proporción poblacional con epilepsia activa (con crisis recurrentes o la necesidad de tratamiento) es de entre cuatro y diez por cada 1000 personas. Aproximadamente cinco millones de personas son diagnosticadas con la enfermedad cada año y en países de altos ingresos se estima que el diagnóstico se da en 49 por cada 100,000 personas, mientras que en países de bajo o medio ingreso la cifra puede ser de hasta 139 por cada 100,000. Además, la prevalencia es mayor en estos últimos países, donde existe aproximadamente el 80% de pacientes con epilepsia, sobre todo en África subsahariana y América Latina (WHO, 2023).

En México se han reportado tasas de prevalencia de entre 3.9 y 42.2 por cada 1000 habitantes. Estas tasas son similares a las de otros países de Latinoamérica y superiores a las de países con altos ingresos (Noriega-Morales & Shkurovich-Bialik, 2020). Esta proporción se refleja en el 1-2% de la población total en el país, con un número aproximado de dos millones de personas (Fundación UNAM, 2019; Valdés-Galván et al., 2019).

### **1.1.2 Definición**

En 2005, el grupo de trabajo de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) definió conceptualmente a la epilepsia como un trastorno cerebral caracterizado por una predisposición duradera para generar crisis epilépticas recurrentes, espontáneas e impredecibles con consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales. Donde una crisis epiléptica es un evento transitorio de signos y/o síntomas debido a actividad neuronal anormalmente excesiva o sincrónica en el cerebro. De esta manera, la epilepsia requiere de la ocurrencia de al menos una crisis epiléptica en el tiempo de vida, así como una alteración cerebral perdurable (Fisher et al., 2005).

La revisión de la definición puede ser beneficiosa porque conceptualmente la epilepsia se presenta tras al menos una crisis no provocada, donde existe un alto riesgo de una subsecuente

(Berg et al., 1991; Hauser et al., 1998). No obstante, conceptualmente la decisión de tratamiento no equivale a un diagnóstico de epilepsia, así como el diagnóstico de epilepsia no necesariamente implica la necesidad de tratamiento. Esto se debe a que existen casos donde los pacientes que presentaban crisis en la infancia dejan de hacerlo en la adultez, posiblemente con una epilepsia resuelta. Sin embargo, cabe destacar que la decisión de tratamiento se puede tomar como un marcador de predisposición a presentar futuras crisis (Fisher et al., 2014).

En 2014, la ILAE se encargó de extender la definición para tener carácter práctico y clínico. Así, la epilepsia se definió como una enfermedad del cerebro caracterizada por cualquiera de las siguientes condiciones:

1. Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con más de 24 horas entre ellas.
2. Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de más crisis similar al riesgo de recurrencia general (al menos del 60%) tras dos crisis no provocadas dentro de los próximos 10 años.
3. Diagnóstico de un síndrome de epilepsia.

La epilepsia se considera resuelta para aquéllos que hayan tenido un síndrome de epilepsia dependiente de la edad, pero ya superaron dicha edad o para los que se han mantenido libres de crisis por los últimos 10 años, sin tratamiento con fármacos anticrisis (FACs) en los últimos cinco años (Fisher et al., 2014).

### **1.1.3 Clasificación de las crisis epilépticas y las epilepsias.**

En 2017, la ILAE publicó dos artículos con la clasificación de las crisis epilépticas y los tipos de epilepsia actualizadas, junto con un manual de instrucciones para aplicar la clasificación de crisis (Fisher et al., 2017a, 2017b; Scheffer et al., 2017).

El criterio de clasificación actual involucra un sistema multinivel con tres niveles de análisis. El primero de ellos consta de determinar el tipo de crisis epiléptica, definido por su inicio: focal, generalizado o desconocido. El segundo nivel se encarga de determinar el tipo de epilepsia y, por último, el tercero abarca los síndromes epilépticos (Fisher et al., 2017a). De manera similar a los tipos de crisis epilépticas, los tipos de epilepsia incluyen focal, generalizada o ambas (incluso desconocida en algunas circunstancias).

En cuanto a las crisis epilépticas focales, son eventos de actividad eléctrica anormal que aparentemente se origina en un solo hemisferio cerebral, aunque en algunos casos puede propagarse al otro hemisferio durante la crisis. Un amplio rango de síntomas se puede presentar dependiendo del sitio de origen y su propagación en el cerebro. La consciencia puede estar presente, ausente o reducida, y algunas veces se presentan tirones de una extremidad y espasmos epilépticos (que pueden tener un origen focal). La propagación de la actividad eléctrica anormal puede ser rápida, generando una crisis tónico-clónica a partir de una crisis focal conocida como una crisis tónico-clónica focal a bilateral (Brodie et al., 2018).

Por otro lado, las crisis generalizadas son eventos de actividad eléctrica anormal que aparentemente se origina simultáneamente en ambos hemisferios cerebrales y se propaga mediante las redes neuronales. Debido a que la mayoría de ellas cursan con estados de conciencia alterados, únicamente se subclasifican en motoras y no motoras (Fisher et al., 2017a). Dentro de las crisis motoras se encuentran las tónicas, clónicas, tónico-clónicas (también llamadas crisis convulsivas), mioclónicas, atónicas, mioclónicas-atónicas, mioclónicas-tónicas-clónicas y espasmos epilépticos. Tanto las crisis atónicas como las tónicas pueden resultar en caídas y espasmos epilépticos, donde existe una contracción muscular breve y brusca predominantemente en el tronco y músculos proximales de las extremidades. Mientras que las crisis no motoras están representadas por las

crisis de ausencia y sus variedades (Brodie et al., 2018; Capote et al., 2009; Fisher et al., 2017a). En aquellos casos donde se desconoce el sitio de origen de la actividad epiléptica, la crisis es denominada como de inicio desconocido (Fisher et al., 2017a) (Fig. 1).

Dentro de las epilepsias generalizadas hay un grupo de síndromes de epilepsia comunes: epilepsia de ausencia infantil, epilepsia de ausencia juvenil, epilepsia mioclónica juvenil, y crisis tónico-clónicas generalizadas. Este grupo ha sido conocido como epilepsias generalizadas idiopáticas, haciendo referencia a que la causa exacta es desconocida, pero se sugiere un fuerte componente genético y, en algunos casos, hereditario (Brodie et al., 2018).

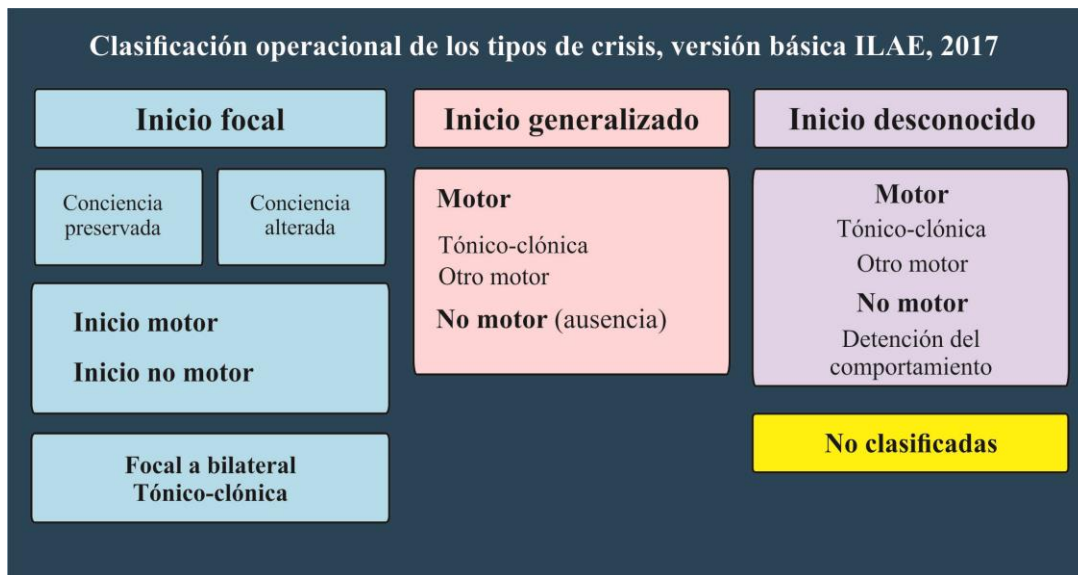


Figura 1. Clasificación por tipo de crisis epiléptica según la ILAE (Fisher et al., 2017a).

Ocasionalmente no se puede determinar con certeza si la epilepsia es focal o generalizada. Esto es más común en países con bajos recursos, donde la prevalencia de epilepsia es dos o tres veces mayor que en países desarrollados y la incidencia también es alta (Preux & Druet-Cabanac, 2005; WHO, 2023) (Fig. 2). La dificultad en el diagnóstico tiene relación directa con el acceso limitado a técnicas de diagnóstico como los estudios video-electroencefalográficos (vEEG) o de imagenología cerebral como la imagenología por resonancia magnética (Brodie et al., 2018).

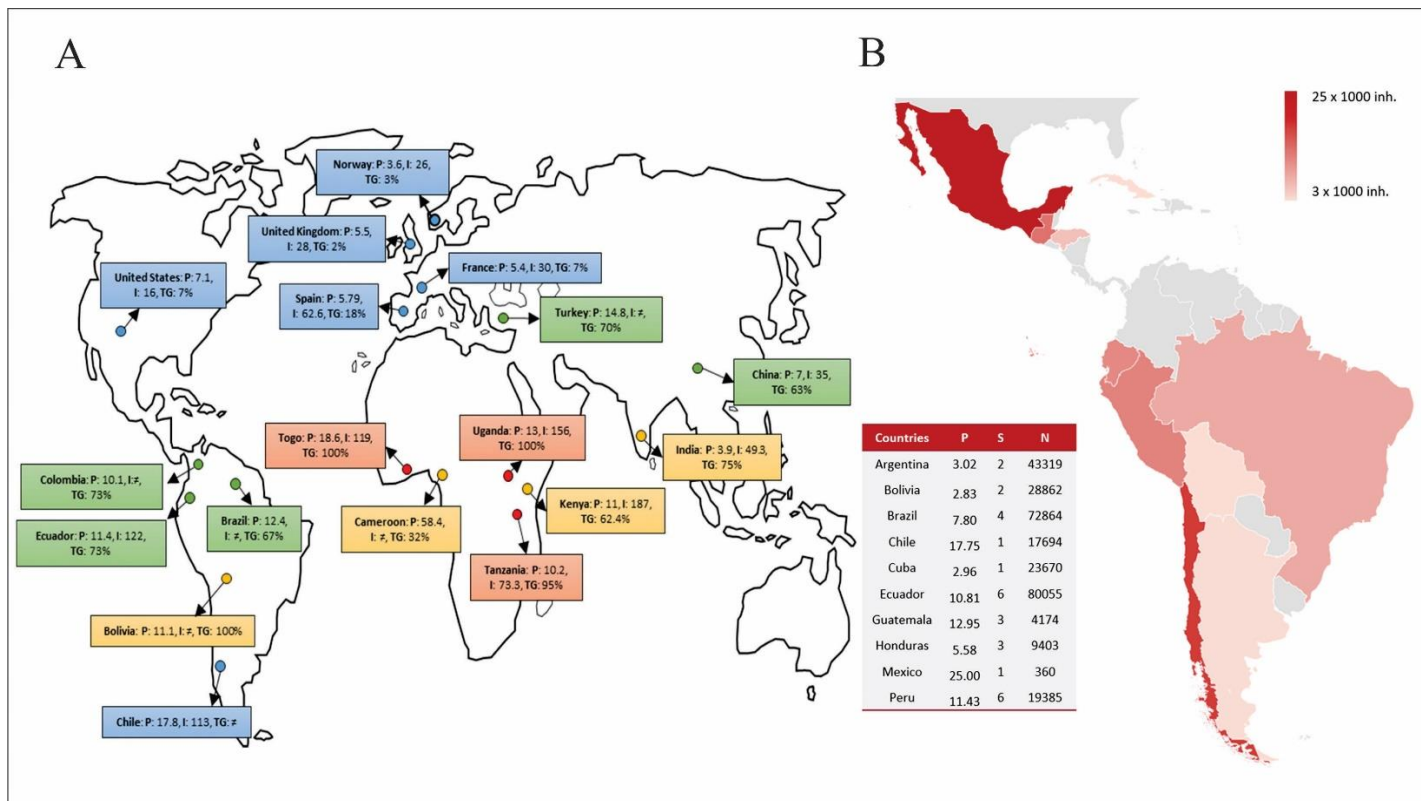


Figura 2. Diferencias en la prevalencia, incidencia y brecha de tratamiento en la epilepsia entre varios países. (A) El color de los círculos representa la clasificación por países del Banco Mundial de acuerdo con su ingreso nacional bruto per cápita; rojo = ingreso bajo, amarillo = ingreso medio bajo, verde = ingreso medio alto, azul = ingreso alto (Espinosa-Jovel et al., 2018). (B) Distribución geográfica de epilepsia activa en Latinoamérica y el Caribe. El sombreado gris representa a los países sin datos y los tonos más oscuros de rojo indican mayor prevalencia de epilepsia activa (Alva-Díaz et al., 2021). N = tamaño de muestra acumulada; S = número de estudios incluidos; P = prevalencia de epilepsia activa, número de casos por cada 1000 personas; I = Incidencia de epilepsia, número de casos nuevos por cada 100,000 personas en un año; TG = brecha de tratamiento expresada como porcentaje. ≠ no hay datos.

Finalmente, el tercer nivel de diagnóstico es la identificación de un síndrome de epilepsia. En éste se incluye un grupo de características como tipos de crisis, cambios en el electroencefalograma (EEG), anomalías en la imagenología cerebral, y análisis genéticos, todo llevando a patrones reconocibles. La importancia del reconocimiento de un posible síndrome radica en la utilidad para determinar la causa, el tratamiento y desenlace de la epilepsia (Brodie et al., 2018) (Fig. 3).

Existe otro grupo de síndromes de epilepsia con inicio focal. El diagnóstico usualmente se basa en la presencia de espigas con un patrón particular en el EEG que se relaciona con actividad eléctrica anormal en un área cerebral particular (Koutroumanidis et al., 2017). Estas condiciones pueden responder al tratamiento y normalmente afectan a los lóbulos temporales, frontales u

occipitales. En este sentido, reconocer un síndrome en particular puede ser de relevancia para una mejor aproximación en el tratamiento y producir el desenlace deseado, potencialmente resolver la epilepsia del paciente (Brodie et al., 2018; Fisher et al., 2014).

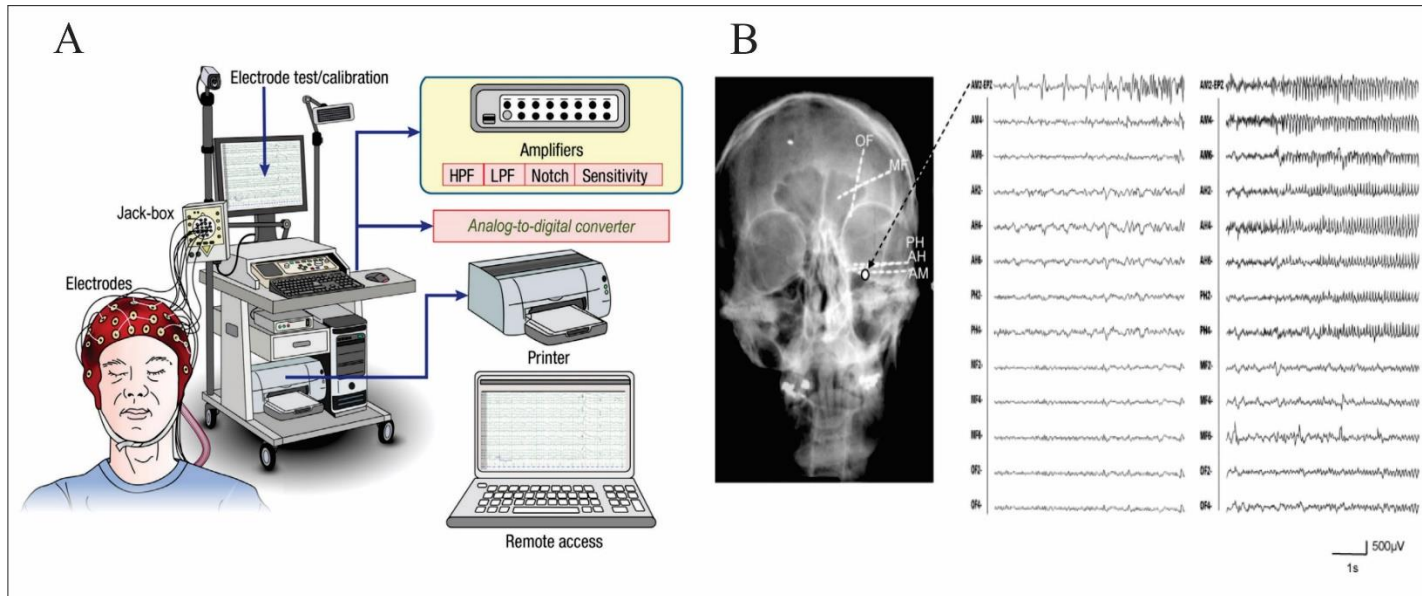


Figura 3. (A) Diagrama esquemático de una máquina para llevar a cabo un registro EEG (Feyissa & Tatum, 2019). (B) Registro multicanal de EEG con electrodos de profundidad implantados en la amígdala (AM), hipocampo anterior (AH), hipocampo posterior (PH), y en las regiones orbitofrontal (OF) y frontal mesial (MF) que muestra la propagación rápida del inicio de la crisis en la amígdala (electrodo AM2) hacia las regiones frontales. La radiografía muestra el posicionamiento de los electrodos (Noachtar & Rémi, 2009).

Por último, la clasificación también contempla, para propósitos clínicos y de diagnóstico, la etiología de la epilepsia: estructural, genética, infecciosa, metabólica, inmune o desconocida. Las causas no son mutuamente excluyentes, ya que pueden actuar en conjunto para provocar la enfermedad o síndrome. Asimismo, se toman en cuenta las comorbilidades — condiciones asociadas con la epilepsia — que incluyen problemas de aprendizaje, discapacidad intelectual, depresión, psicosis y trastornos del espectro autista (Brodie et al., 2018; Scheffer et al., 2017).

#### 1.1.4 Diagnóstico de la epilepsia

El diagnóstico puede ser complicado porque el sello eléctrico de diagnóstico de la epilepsia puede estar ausente, sobre todo en adultos o si las crisis son infrecuentes. La actividad epileptiforme también puede estar presente ocasionalmente en individuos sin crisis. Esto puede suceder en



encefalopatías epilépticas, donde las crisis pueden ser pocas o nulas, y un trastorno cognitivo es predominante (Manford, 2017). Por lo tanto, el EEG y el electrocorticograma (ECoG) son pilares dentro de las herramientas existentes para confirmar la actividad paroxística asociada a la epilepsia que permiten el estudio de los marcadores funcionales más relevantes: las descargas ictales. Además, puesto que ciertos grafoelementos (cualquier patrón de EEG distinguible de la actividad de fondo en curso) anormales se asocian fuertemente con fenotipos clínicos distintos de epilepsia, el EEG ha sido una herramienta decisiva para la clasificación de convulsiones y epilepsias. Algunos grafoelementos incluyen el “cepillo delta” —ondas delta con actividad rápida sobrepuesta— o el theta temporal rítmico. (Kane et al., 2017; Koutroumanidis et al., 2017). Otras técnicas importantes para el diagnóstico incluyen estudios de imagen como la imagenología por resonancia magnética o la tomografía axial computarizada (Epilepsy Society, 2020).

La ocurrencia y comportamiento de grafoelementos diagnósticos del EEG son dinámicos, sujetos a una gran cantidad de moduladores que interactúan entre sí: edad del paciente, estado del curso del síndrome, hora del día, estado de alerta y adecuación del sueño, medicamentos, y posiblemente otros factores ambientales (Koutroumanidis et al., 2017). La caracterización completa de un síndrome de epilepsia puede no ser posible desde un registro interictal estándar durante el sueño o la vigilia. Los EEGs durante la vigilia pueden mostrar ausencia de descargas epilépticas en un número considerable de personas con epilepsia conocida (Ebersole & Pedley, 2003; Pillai & Sperling, 2006), mientras que durante el sueño pueden presentar mucho mayor número de éstas (Binnie & Stefan, 1999), sobre todo tras privación del sueño (Rowan et al., 1982). Además, la aparición de descargas o crisis epilépticas puede depender de activación estándar (como hiperventilación, que puede promover descargas espiga-onda generalizadas o ausencias) o activación específica (como leer). Por lo tanto, los registros de EEG pueden ser personalizados de

acuerdo con la hipótesis de diagnóstico y la información clínica disponible (Koutroumanidis et al., 2017).

El proceso de diagnóstico de epilepsia cumple dos propósitos: identificar la semiología clínica completa y definir el tipo o síndrome de epilepsia, además de encontrar la causa subyacente. El EEG contribuye directamente al diagnóstico clínico, pero no etiológico. Un patrón característico (como una descarga espiga onda focal) puede trascender diferentes etiologías, mientras que las epilepsias dentro de una misma clase etiológica (e.g., genética) pueden tener perfiles diferentes del EEG (Berg et al., 2010; Koutroumanidis et al., 2017; Scheffer et al., 2017).

En el caso de las crisis focales, el EEG posibilita la identificación del área cerebral donde se origina la crisis y la imagenología por resonancia magnética permite determinar una posible causa estructural para el evento, como cicatrización, anomalías anatómicas de desarrollo, un absceso — una cavidad donde se acumula pus debido a una infección (National Library of Medicine, 2021) —, accidente cerebrovascular, o tumor. Sin embargo, en alrededor del 30% de las personas con crisis focales, las imágenes obtenidas por resonancia magnética se ven normales (Brodie et al., 2018).

Cuando un caso de epilepsia no responde a los medicamentos, el tratamiento quirúrgico puede ser una opción. El ECoG es útil en las cirugías para delimitar las zonas epileptogénicas y guiar la resección del foco epiléptico (Tripathi et al., 2010). Idealmente, una cirugía se puede realizar cuando la zona epileptogénica puede ser removida. No obstante, aunque muchas veces el área específica responsable de las crisis puede ser identificada de manera no invasiva, en otras ocasiones no es así. En estos casos, para obtener información EEG más precisa, se utiliza el ECoG — colocando electrodos directamente sobre la superficie cerebral — que permite determinar el origen de las crisis (American Association of Neurological Surgeons, 2023).

### 1.1.5 Fármacos anticrisis (FACs)

La primera línea de tratamiento para la epilepsia es la administración de FACs, que se dividen en primera, segunda y tercera generación (Landmark & Patsalos, 2010).

Los FACs de primera generación más comúnmente usados son fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, zonisamida (considerado de segunda generación en Europa y Norteamérica), y clobazam (Hanaya & Arita, 2016). Otros fármacos recientes se han incluido en la segunda generación: gabapentina, topiramato, lamotrigina, levetiracetam, rufinamida, vigabatrina, oxcarbazepina, perampanel, entre otros. (Glauser et al., 2013). Finalmente, la tercera generación incluye fármacos como lacosamida y acetato de eslicarbazepina (Hanaya & Arita, 2016) (Tabla 1).

Primera generación	Segunda generación	Tercera generación
<ul style="list-style-type: none"><li>- Fenitoína</li><li>- Fenobarbital</li><li>- Carbamazepina</li><li>- Ácido valproico</li><li>- Zonisamida</li><li>- Clobazam</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Gabapentina</li><li>- Topiramato</li><li>- Lamotrigina</li><li>- Levetiracetam</li><li>- Rufinamida</li><li>- Vigabatrina</li><li>- Oxcarbazepina</li><li>- Perampanel</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lacosamida</li><li>- Acetato de eslicarbazepina</li></ul>

Tabla 1. FACs comúnmente usados de primera, segunda y tercera generación (Hanaya & Arita, 2016).

#### 1.1.6.1 Mecanismos de acción de FACs

La mayoría de los FACs ejerce su mecanismo de control sobre las crisis epilépticas mediante neurotransmisión GABAérgica (ganaxolona, valproato, retigabina, topiramato) o glutamatérgica (perampanel) involucrando canales iónicos de sodio (fenitoína, lacosamida, rufinamida, acetato de eslicarbazepina, topiramato) o calcio (etosuximida) (French & Faught, 2009). Otros mecanismos abarcan a los receptores AMPA (perampanel, topiramato) y CMRP2 (lacosamida), la liberación

de calcio intracelular (gabapentina) y la inhibición de la actividad de la anhidrasa carbónica (topiramato) (Stephen & Brodie, 2011).

El espectro de acción de los FACs generalmente se caracteriza por la interacción con canales iónicos (como fenitoína, lacosamida, o etosuximida) o sistemas de neurotransmisión (como ganaloaxona, valproato o perampanel); sin embargo, la evidencia del efecto diferencial en síndromes específicos sigue en aumento (Manford, 2017).

De los fármacos disponibles, la etosuximida tiene el mecanismo más específico en cuanto a su rol en la epilepsia de ausencia, actuando en los canales de calcio tipo T (Coulter et al., 1989). Estos canales se han visto implicados en la perturbación talamocortical que desde hace décadas se cree que subyace las epilepsias generalizadas (Jasper & Kershman, 1941). Tanto el valproato como la etosuximida han demostrado mayor eficacia sobre la lamotrigina en la epilepsia de ausencia infantil (Glauser et al., 2010). Además, se ha sugerido que la etosuximida podría estar asociada con mayor probabilidad de remisión a largo plazo (Berg et al., 2014). Se ha visto que la remoción selectiva de los canales P/Q en neuronas de la capa VI que proveen la proyección cortical descendiente hacia el tálamo produce una actividad de espiga onda con ausencias clínicas suprimidas por etosuximida. Esto promueve la idea que una anomalía cortical altamente específica es necesaria y suficiente para generar oscilaciones talamocorticales de epilepsia de ausencia (Bomben et al., 2016).

A pesar de la fuerte evidencia de una base genética para la epilepsia generalizada idiopática los genes relevantes han sido esquivos, dificultando los esfuerzos para identificar objetivos farmacológicos. Un estudio de asociación a nivel genómico sugirió vínculos con el gen SCN1A, así como PCDH7 y PCDH19, que codifican protocadherinas (Anney et al., 2014). Ahora se sabe que el síndrome de Dravet comúnmente se debe a truncamientos genéticos que llevan a una pérdida

total de la función o a mutaciones que causan una pérdida parcial de la función del canal de sodio, generalmente SCN1A (Claes et al., 2001; Oliva et al., 2012). Este canal se encuentra en interneuronas inhibitorias, lo que causa hiperexcitabilidad y crisis como resultado de la pérdida de la función (Manford, 2017).

La retigabina incrementa la actividad de los canales KCNQ2 (Wickenden et al., 2000) y se ha usado para tratar la encefalopatía epiléptica neonatal asociada con mutaciones de función reducida de dicho canal con cierto éxito (Millichap et al., 2016).

El tratamiento con memantina, antagonista del receptor NMDA comúnmente usado en la enfermedad de Alzheimer, podría ser beneficioso para los niños con una encefalopatía severa debido a las mutaciones GRIN2B que producen una ganancia de función en el receptor (Li et al., 2016).

KCNT1 codifica un canal de potasio activado por sodio que ha sido implicado en la epilepsia parcial migratoria infantil y en la epilepsia frontal autosómica dominante, ambas causando un aumento de función (Milligan et al., 2014). La quinidina — un bloqueador de la corriente entrante rápida de sodio — ayudó a dos niños con esta mutación y un fenotipo severo de epilepsia (Mikati et al., 2015).

#### **1.1.6.2 Efectos adversos de FACs**

El uso de FACs presenta efectos adversos que incluyen mareo, fatiga, náuseas, sedación, cambios de comportamiento y teratogenicidad, afectando la calidad de vida del paciente; por ello se debe realizar estudios de daño hepático y renal al menos cada tres o seis meses (Löscher & Schmidt, 2011). Más específicamente, se pueden producir efectos sobre el SNC, así como problemas generales y sobre el sistema humoral y esplénico. Dentro de los problemas sobre el SNC se encuentran somnolencia, insomnio, sedación/aletargamiento motor, depresión, problemas

conductuales, episodios psicóticos, deterioro cognitivo, ataxia, mareo, y encefalopatía. Por su parte, los problemas generales incluyen hipersensibilidad, sarpullido, fatiga, ganancia o pérdida de peso y agravamiento de las crisis. En cuanto al sistema humoral y esplénico, los efectos adversos que pueden presentarse son leucopenia, hiponatremia, problemas gastrointestinales, pancreatitis, y nefrolitiasis (Hanaya & Arita, 2016).

Asimismo, se ha visto por varios años que los fármacos bloqueadores de canales de sodio, como la carbamazepina, pueden ser perjudiciales para los niños con síndrome de Dravet (Guerrini et al., 1998; Horn et al., 1986).

Por otro lado, la retigabina se retiró en 2017 debido a cambios pigmentarios que podía inducir en la piel, mucosa y ojos (Shkolnik et al., 2014).

Finalmente, se sabe que alrededor del 30% de las personas con epilepsia presentan farmacoresistencia, y podrían requerir otras formas de intervención más agresivas, disminuyendo su calidad de vida (Kwan & Brodie., 2000).

### **1.1.6 Modelos experimentales de epilepsia**

En la actualidad no existe un modelo que cubra todos los fenotipos de crisis y reproduzca perfectamente las características en humanos. Por lo tanto, dada la complejidad de las características de las crisis, la selección de modelos puede basarse en necesidades u objetivos particulares en la práctica.

Las especies animales predominantes para los modelos de epilepsia han sido los roedores y uno de los modelos principales que representa el estado epiléptico es la estimulación *kindling* (Wang et al., 2022). El *kindling* clásico consiste en la estimulación eléctrica repetida de las estructuras límbicas llevando a descargas anormales y crisis epilépticas (Gorter et al., 2016), y se divide fundamentalmente en eléctrico y químico. El primero hace referencia a electrodos de

profundidad implantados en la región cerebral límbica — amígdala e hipocampo — o a la estimulación tópica de las córneas (Becker, 2018). Por el contrario, el *kindling* químico consiste en la inyección sistémica de sustancias excitatorias en el cerebro (Shimada & Yamagata, 2018).

De esta manera, los modelos experimentales se dividen en diferentes clases de acuerdo con el tipo de crisis o característica que se busque estudiar (Wang et al., 2022):

- Modelos de crisis generalizadas tónico-clónicas:
  - Modelo de electrochoque máximo.
  - Inyección intraperitoneal o en la vena caudal de pentilentetrazol (PTZ).
  - Inyección intravítrea de NMDA.
  - Inhalación de flurotilo.
  - Inyección intraperitoneal de NMDA.
  - Modelo de lesiones por percusión de fluidos.
  - Modelo de aceleración-impacto.
  - Modelo de lesiones cerradas en la cabeza.
  - Inyección intracortical de ion de hierro.
  - Modelo de crisis audiogénicas.
  - Optogenética.
- Modelos no convulsivos:
  - Modelo de lesión cerebral similar a una lesión balística con penetración.
  - Modelo de explosión.
- Modelos de crisis de ausencia:
  - Administración sistémica de gamma hidroxibutirato.
  - Inyección intraperitoneal de PTZ.

- Ratas de Estrasburgo con epilepsia de ausencia genética.
- Ratas WAG/Rij.
- Ratón Tottering-6j.
- Modelos de mioclonía:
  - Estimulación eléctrica corneal a 6 Hz.
  - Inyección intraperitoneal o subcutánea de PTZ.
- Modelos de estatus epiléptico:
  - Estimulación eléctrica del hipocampo o la amígdala.
  - Inyección subcutánea, intraperitoneal o intrahipocampal de ácido kaínico (KA).
  - Inyección subcutánea o intraperitoneal de pilocarpina.
  - Inyección subcutánea o intraperitoneal de PTZ.
- Modelos de epilepsia de lóbulo temporal:
  - Estimulación eléctrica de la amígdala.
  - Inyección subcutánea o intraperitoneal de KA.
  - Inyección intracerebroventricular, intraamigdalina o intrahipocampal de KA.
  - Inyección subcutánea de KA y lorazepam.
  - Inyecciones intraperitoneales graduadas de KA.
  - Inyección intrahipocampal o intracerebroventricular de pilocarpina.
  - Inyección intramuscular de coriaria lactona.
  - Inyección intracerebroventricular de Theiler.
  - Inyección intrahipocampal de la toxina tetánica.
  - Inyección intrahipocampal de penicilina.



- Febril.
- Impacto cortical controlado.
- Isquemia/hipoxia.

Particularmente, el modelo de crisis generalizadas tónico-clónicas por inyección de PTZ en roedores es de primera elección y presenta ventajas al constituir un procedimiento simple y de bajo costo, siendo útil en la evaluación de nuevos compuestos que pudieran tener un efecto en la contención de las crisis. El PTZ se acopla al receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico<sub>a</sub> (GABA<sub>A</sub>), actuando como un potencial agente epileptogénico (Lu et al., 2020). La inyección — caudal o intraperitoneal — puede inducir crisis tónico-clónicas en ratas y ratones (González-Trujano et al., 2018; Jamali & Heydari, 2020). Los roedores en este modelo presentan movimientos involuntarios de la cabeza, extremidades anteriores o posteriores y una subsecuente caída, crisis convulsiva clónica y extensión completa de las extremidades (González-Trujano et al., 2018).

## **1.2 Herbolaria con fines medicinales**

El uso de las plantas con fines medicinales ha impactado en el tratamiento de padecimientos del SNC con un porcentaje aproximado del 3.3% (Pérez-Ortega & González-Trujano, 2015). Diversas especies vegetales pueden producir diferentes acciones farmacológicas debido a sus componentes químicos. De esta manera se han clasificado como: psicoanalépticas (estimulantes), psicodislépticas (alucinógenas) y psicolépticas (depresoras). Algunas especies endémicas poseen propiedades depresoras del SNC y son útiles como ansiolítico-sedantes, tal es el caso de: *Annona macrophyllata* Donn. Sm. (zapote), *Citrus x sinensis* (L.) Osbeck (azahares de naranja dulce), *Dracocephalum moldavica* L. (toronjil extranjero), *Galphimia glauca* Cav. (árnica roja), *Heteropterys brachiata* (L.) DC. (palo de margarita), *Litsea glaucescens* Kunth (laurel), *Salvia*

*elegans* Vahl (mirto o salvia roja), *Justicia spicigera* Schltdl. (muicle), entre muchas otras (Pérez-Ortega & González-Trujano, 2015; Tortoriello y Romero, 1992).

Las plantas medicinales han sido fundamentales en el desarrollo de la medicina y la obtención de fármacos. Mediante diversas técnicas ha sido posible identificar, caracterizar y aislar diversidad de principios activos responsables de las propiedades farmacológicas y/o terapéuticas atribuidas a éstas. Dichas técnicas de cromatografía son las convencionales de capa fina, columna abierta y, de mayor precisión y especificidad, la cromatografía líquida de alta resolución. Con ellas ha sido posible identificar incluso posibles mecanismos de acción involucrados en su actividad medicinal (Moreno-Pérez et al., 2021; Pérez-Ortega et al., 2016).

### **1.2.1 Plantas medicinales con actividad anticonvulsiva**

Las plantas medicinales son la aproximación más común en medicamentos complementarios y alternativos, tomando un rol importante en la terapia para el control de crisis epilépticas o en aquellos pacientes que no responden al tratamiento farmacológico. En países desarrollados son utilizadas con dicho propósito, mientras que en países en desarrollo a menudo se emplean como sustituto de la medicina científica occidental ortodoxa y como tratamiento complementario (Schachter, 2009).

La medicina herbal tradicional es amplia y abarca regiones como América, Asia y África. Algunas de las plantas tradicionales usadas con este propósito pertenecen a las familias Apocynaceae, Euphorbiaceae y Lamiaceae, donde especies tales como *Bryonia alba* L., *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming, *Cannabis sativa* L., *Ficus platyphylla*, *Gladiolus dalenii* Van Geel, *Lavandula officinalis* Chaix, *Lavandula stoechas* L., *Panax quinquefolius* L., *Passiflora incarnata* L., *Pimpinella anisum* L., *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Salvia haematodes* L., *Salvia leriifolia* Benth., *Scutellaria lateriflora* L., *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq., *Viscum album* L.,

*Zingiber officinale* Roscoe, y *Ziziphus jujuba* Mill. se han reportado con propiedades depresoras del SNC y como anticonvulsivas. Los blancos moleculares descritos como sitios de acción de estas especies han sido el receptor GABA<sub>A</sub>, NMDA, canales iónicos, receptores cannabinoides y serotoninérgicos (Akbar et al., 1984; 1985; Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006; Liu et al., 2017).

### **1.2.2 *Salvia circinnata* Cav. (Sinónimo *S. amarissima* Ortega)**

Lamiaceae es una de las familias de plantas más reconocidas mundialmente por su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de distintas enfermedades (Hernandez-Leon et al., 2021). La familia contiene 241 géneros y aproximadamente 7530 especies (Christenhusz & Byng, 2016). En México, Lamiaceae es la octava familia con mayor diversidad representando 13.55% del género y 8.23% de las especies en el mundo. Su endemismo es del 66.2% (Martínez-Gordillo et al., 2017). El género más diverso de esta familia en nuestro país es *Salvia*, con 306 especies, donde se incluye a la *S. circinnata* Cav. ó *S. amarissima* Ortega como sinónimo (González-Gallegos et al., 2020). Además, las especies del género *Salvia* cuentan con distintas propiedades farmacológicas que incluyen efecto antibacterial, insecticida, antidiabético, antinociceptivo, antiinflamatorio, para afecciones gastrointestinales y cardiovasculares e incluso antitumoral o anticitotóxico (Moreno-Pérez et al., 2021).

Respecto a los efectos farmacológicos en el SNC de especies de *Salvia*, se han reportado con actividad sedante-hipnótica (*S. guaranitica* A. St. -Hill. ex Benth.), alucinógena (*S. divinorum* Epling & Játiva), ansiolítica (*S. semiatrata* Zucc.), relajante muscular, analgésica (*S. circinnata* y *S. semiatrata*), de mejora en la memoria, y anticonvulsiva (*S. haematodes* y *S. leriifolia*) (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006; Moreno-Pérez et al., 2019; 2021; Ortiz-Mendoza et al., 2020; Tlacomulco-Flores et al., 2020).

*S. circinnata* es una hierba nativa de México y es usada para tratar trastornos del SNC, así como afecciones gastrointestinales (Moreno-Pérez et al., 2021). Los extractos se han evaluado farmacológicamente por su uso para el alivio del dolor abdominal, nociceptivo, inflamatorio y disfuncional (nociplástico) (Moreno-Pérez et al., 2019; 2021; 2022), así como para afecciones gastrointestinales y metabólicas, tal como en la diabetes tipo 2 por su acción de tipo alfa-glucosidasa (Solares-Pascasio et al., 2021). Sin embargo, no se sabe si el potencial depresor del SNC de esta especie medicinal puede ser de utilidad para la terapéutica de la epilepsia.

## **2. Planteamiento del problema**

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más importantes en México y en el mundo debido a que millones de personas la padecen y, aunque muchos pacientes alcanzan un buen control, hasta un 30% de ellos no responden al tratamiento farmacológico a pesar de la variedad de tratamientos para el control de las crisis. Esto lleva a la posibilidad de requerir formas de tratamiento más agresivas, afectando la calidad de vida de los pacientes. (Kwan & Brodie, 2000; Noriega-Morales & Shkurovich-Bialik, 2020). Además, hasta el 2017, la probabilidad de que un paciente quedara libre de crisis cambió poco, a pesar de la disponibilidad de más FACs (Brodie, 2017).

Adicionalmente, el acceso a los medicamentos puede ser limitado, sobre todo en países con bajos ingresos y en áreas rurales, donde la epilepsia tiene una alta prevalencia, pero es subdiagnosticada (Preux & Druet-Cabanac, 2005). En ese marco, las razones por las que los pacientes con epilepsia suelen tomar medicina herbal incluyen factores económicos, actitudes culturales hacia la medicina científica occidental ortodoxa, y como sustituto de medicina sintética que no logra controlar las crisis (Liu et al., 2017). Por lo anterior, la búsqueda de evidencia científica sobre la seguridad y eficacia de alternativas terapéuticas como los productos naturales

es requerida, no sólo como empíricamente se han usado desde tiempos ancestrales, sino además con la finalidad de encontrar posibles nuevos fármacos que incrementen el armamento farmacológico actual.

### **3. Justificación**

La búsqueda de alternativas para el tratamiento de la epilepsia es necesaria y constante, especialmente para aquéllos que no responden al tratamiento farmacológico y que no son candidatos a cirugía para remoción del foco epiléptico. En este sentido, las plantas medicinales se han utilizado por más de cinco mil años por su potencial terapéutico y muchos extractos de ellas han mostrado actividad anticonvulsiva. De esta manera, su investigación puede llevar a oportunidades para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos y al conocimiento de mecanismos moleculares que subyacen al inicio, desarrollo y establecimiento de la epilepsia (Liu et al., 2017; Sucher & Carles, 2015).

A pesar de los estudios farmacológicos y el espectro de actividad medicinal hasta ahora conocido de *Salvia circinnata* no se ha reportado alguna investigación sobre su potencial para el manejo y/o control de las crisis convulsivas. En el presente proyecto de tesis se propone realizar la evaluación neurofarmacológica y electrocorticográfica de extractos polares de esta especie para la búsqueda de evidencia científica que permita conocer su potencial neuroprotector sobre el SNC para inhibir la actividad paroxística mediante un modelo preclínico.

### **4. Hipótesis**

El extracto acuoso de *S. circinnata* producirá efecto neuroprotector al reducir la incidencia y duración y aumentar la sobrevivencia en las crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol en ratones.

## 5. Objetivos

### 5.1 General

Evaluar la actividad neuroprotectora y electrocorticográfica del extracto acuoso de *S. circinnata* en las crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol en ratones.

### 5.2 Específicos

- Preparar el extracto acuoso de la parte aérea de *S. circinnata* por decocción y posterior liofilización.
- Elaborar el perfil cromatográfico del extracto acuoso de *S. circinnata* mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- Realizar cirugía estereotáxica para el implante de electrodos corticales y evaluar la actividad electrocorticográfica.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *S. circinnata* en la latencia, incidencia, duración y sobrevivencia de los ratones en las crisis clónicas y tónico-clónicas inducidas con PTZ.
- Evaluar el perfil ECoG del extracto acuoso de *S. circinnata* en ratones.
- Evaluar el efecto del metabolito activo de *S. circinnata*, amarisolida A, en la latencia, incidencia, duración y sobrevivencia de los ratones en las crisis clónicas y tónico-clónicas inducidas con PTZ.
- Evaluar el perfil ECoG de amarisolida A en ratones.
- Evaluar la participación de receptores inhibidores (GABA<sub>A</sub> o 5-HT<sub>1A</sub>) como posible mecanismo de acción en la respuesta anticonvulsiva de amarisolida A.

## **6. Protocolo experimental**

### **6.1 Animales**

Ratones macho de la cepa Swiss-Webster (SW) con un peso de 25-35 gramos. Los roedores fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRFM), los cuales fueron colocados en cajas de acrílico a una temperatura controlada de (22°± 1°C) con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos técnicos para la producción, cuidado y uso de animales en el laboratorio de la SAGARPA México (NOM-062 ZOO-1999) y la aprobación del comité de ética del INPRFM (Proyectos NC123280.0 y NC123240.1).

### **6.2 Fármacos**

Pentilentetrazol, WAY-100135 (WAY) y 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (8-OHDPAT) (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo. USA), pentobarbital sódico (PISA Agropecuaria), solución salina isotónica (PISA, 0.9% NaCl), ketamina (Laboratorios Aranda), xilacina (PISA Agropecuaria), diazepam (DZP) (PISA Agropecuaria), picrotoxina (PCT) (Merck). Los fármacos se prepararon frescos el día de los experimentos y se disolvieron en agua destilada, los cuales se administraron por vía intraperitoneal (i.p).

### **6.3 Material vegetal**

La identificación del espécimen *S. circinnata* fue realizada por la taxónoma Dr. Martha J. Martínez-Gordillo y depositada en el herbario del IMSS de la Ciudad de México con número de váucher 16360 (Moreno-Pérez et al., 2022).

### **6.4 Colecta**

*Salvia circinnata* fue colectada en la región de Santiago Huaucilla, Oaxaca, en agosto de 2018 (Moreno-Pérez et al., 2022).

## **6.5 Preparación del extracto**

La preparación del extracto acuoso se realizó con la parte aérea de *S. circinnata* seca y molida (50 gramos) y expuesta a una decocción de 20 minutos. Enseguida, el extracto se dejó enfriar, se filtró y el líquido se secó mediante proceso de liofilización obteniéndose 5.125 gramos (10.25%) y así analizar la concentración de amarisolida A.

La presencia de terpenos en los extractos —previamente preparados con el primer lote de material vegetal— se comparó mediante cromatografía de capa fina (CCF), revelada con anisaldehído como reactivo en aerosol bajo luz ultravioleta (365 nm). En este proceso se observó que el extracto de acetato de etilo (AcOEt) contiene la mayor cantidad de amarisolida A, por lo que 540 gramos más de material vegetal se procesaron para obtener más producto de este extracto (25 gramos, 4.62%) y subsecuentemente purificar la amarisolida A. Posteriormente, este segundo extracto se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) para separar 250 subfracciones (20 mL de cada una) usando solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y acetona). Estas subfracciones se agruparon en ocho pools de acuerdo con la similitud en placas de CCF (3.5 x 7 cm) utilizando AcOEt:MeOH (95:5) como fase móvil. Por su parte, la presencia de amarisolida A se detectó como una mancha púrpura intensa tras la aplicación del reactivo en aerosol. La concentración más alta del compuesto se observó en las subfracciones obtenidas con acetona en la CCA. La amarisolida A se aisló como un precipitado y luego se purificó mediante recristalización en cristales amarillos con un rendimiento de 1.2575 gramos (5.03%) a partir del extracto de AcOEt (25 gramos) (Moreno-Pérez et al., 2022).

## **6.6 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

Para el perfil cromatográfico del extracto AcOEt se utilizó una muestra de 5 mg y de amarisolida A de 1mg/kg. Tras el filtrado con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (filtros GHP, Acrodisc 13, Waters), las



muestras fueron inyectadas en un equipo de cromatografía líquida Ultra-Performance (UPLC) Waters Acquity-H equipado con un detector de matriz de fotodiodos (UPLC, Acquity Waters, Wexford, Irlanda). Los datos fueron procesados con el software Empower versión 3 (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) usando las condiciones de 10  $\mu$ L de volumen de inyección; Columna: Symmetry C-18 (150 x 4.6 mm, 5 mm, 100 A (Waters, Wexford, Irlanda) con termostato a 35°C. La fase móvil consistió en acetonitrilo/agua acidificada con ácido fosfórico al 0.1% v/v. La mezcla de gradiente inicial fue de 70% A y 30% B, y la concentración del solvente B se aumentó gradualmente a 70%. Finalmente, el gradiente volvió a las concentraciones iniciales (70:30) en un tiempo total de 12 minutos a una velocidad de flujo constante de 0.7 mL/min y una longitud de onda de detección de 254 nm. La amarisolida A fue detectada en el pico encontrado a los 1.9 minutos de tiempo de retención en el perfil cromatográfico (Moreno-Pérez et al., 2022).

### **6.7 Cirugía e implante de electrodos**

Cirugías estereotáxicas se realizaron para el implante de cuatro tornillos de acero inoxidable de 1 mm de diámetro con la siguiente distribución: dos en ambas cortezas frontales (AP + 2.0 mm; ML 1.0 mm), dos en las parietales (AP - 3.0 mm; ML 2.5 mm) y un electrodo cerebelar de referencia (AP - 5.0 mm; ML 0 mm). Esto con el propósito de llevar a cabo el registro *in vivo* con anestesia previa, como fue establecido anteriormente (Ferry et al., 2014). Después de una semana de recuperación postoperatoria, los ratones estuvieron listos para realizar el registro ECoG y la evaluación de la actividad neuroprotectora (González-Trujano et al., 2018).

Las señales ECoG de las cortezas frontales y parietales se registraron usando un polígrafo GRASS Modelo 8-18D con un ancho de banda de 1-70 Hz digitalizados a una frecuencia de muestreo de 500 Hz.

De igual manera, se realizó un análisis espectral por medio de un programa personalizado (González-Trujano et al., 2022). Los espectros de potencia se obtuvieron de 1-50 Hz en segmentos de 60 segundos en línea base, y 15 y 30 minutos después de la administración de los tratamientos. La potencia absoluta y relativa se calculó para las bandas: delta (1–4 Hz), theta (4–8 Hz), alfa (8–13 Hz), beta (13–30 Hz) y gamma (30–50 Hz) de cada región cortical en cada ratón. Los valores de la potencia relativa fueron normalizados como porcentaje de cambio desde la línea de base.

## **6.8 Diseño experimental**

El diseño se realizó para conocer los efectos dosis-respuesta del extracto acuoso y el metabolito activo en comparación con solución salina y fármacos de referencia solos y en presencia de los antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> y 5-HT<sub>1A</sub> para explorar el mecanismo de acción. Para ello, ochenta y cuatro ratones divididos en 14 grupos ( $n \geq 6$ ) recibieron una dosis aguda de los siguientes tratamientos vía intraperitoneal: 1) solución salina, 2-6) extracto acuoso de *S. circinnata* (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg), 7-8) amarisolida A (0.05 ó 1 mg/kg), 9) PCT (antagonista de GABA<sub>A</sub>, 1 mg/kg) + amarisolida A (1 mg/kg), 10) WAY-100135 (WAY) (antagonista de 5-HT<sub>1A</sub>, 1 mg/kg) + amarisolida A (1 mg/kg), 11) DZP (agonista de GABA<sub>A</sub>, 1 mg/kg) + PCT (1 mg/kg), 12) WAY (1 mg/kg) + 8-OHDPAT (agonista de 5-HT<sub>1A</sub>, 1 mg/kg), 13) 8-OHDPAT (1 mg/kg) y 14) DZP (1 mg/kg) como control positivo. Cada tratamiento se administró 30 minutos antes del PTZ (85 mg/kg), constituyendo el primer experimento (Fig. 1A), a excepción de los fármacos PCT y WAY, donde la administración se realizó 45 minutos previos al PTZ y 15 minutos antes del tratamiento correspondiente (amarisolida A, DZP o 8-OHDPAT), constituyendo el segundo experimento (Fig. 4).

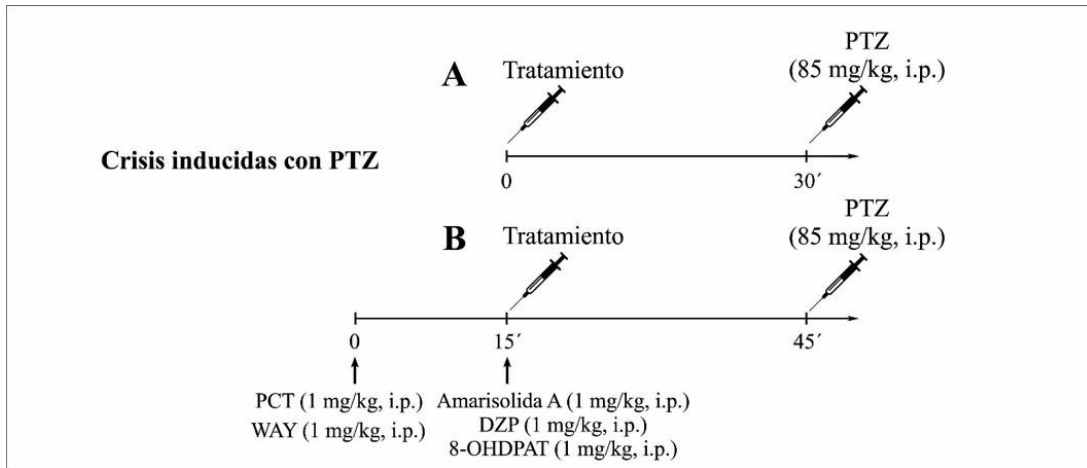


Figura 4. Diseño experimental. Experimento 1 (A). Experimento 2 (B). DZP, diazepam; PTZ, pentilentetrazol; PCT, picrotoxina; i.p., intraperitoneal.

En el registro de ECoG de un control se presenta la evolución del efecto convulsivante del PTZ (85 mg/kg) en el que se pueden observar dos tipos de crisis distinguibles mediante la escala de Lüttjohann (Lüttjohann et al., 2009) de un patrón ECoG característico (Fig. 2A). En primer lugar, se presenta una crisis clónica al minuto, cuando el ratón exhibe levantamiento sobre sus miembros posteriores o clonus bilateral de los miembros anteriores. Una vez terminada la crisis, una depresión postictal se genera seguida de mioclonías para dar lugar a la crisis tónico-clónica. En ésta se presentan brincos salvajes y una extensión tónica de los miembros posteriores, seguida de la muerte del animal (Fig. 5).

Por ello, se evaluó la incidencia (% de ratones que presentaron crisis convulsivas), latencia y duración de las crisis, así como la sobrevivencia. Para ello, se realizaron las mediciones pertinentes de cada una de las métricas durante los experimentos (tanto para las temporales como para las cuantitativas).

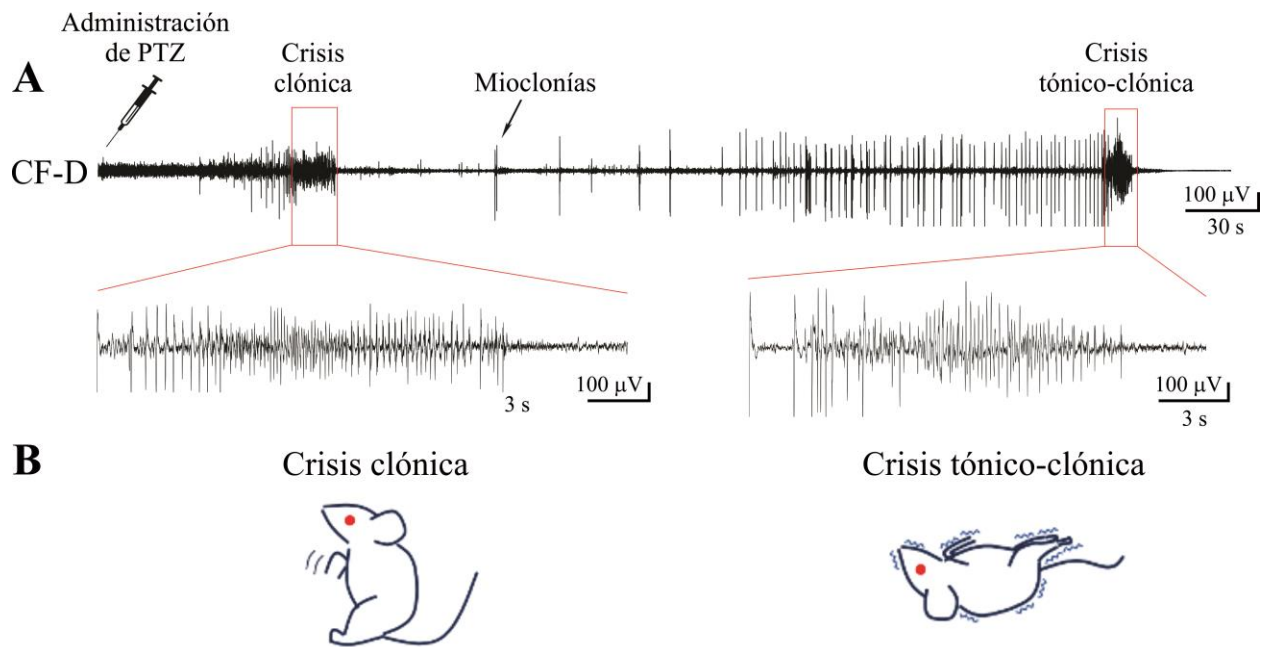


Figura 5. Características de las crisis inducidas con PTZ. Patrón característico de un registro ECoG de ocho minutos en las crisis clónicas y tónico-clónicas (A). Características cualitativas de las crisis clónicas y tónico-clónicas (B).

## 6.9 Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.) de cada tratamiento en al menos seis repeticiones. El análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANADEVA) de una o dos vías para medidas repetidas seguida de la prueba post-hoc de Dunnett en comparación con el control o Bonferroni o Tukey para la comparación entre tratamientos. La potencia relativa entre los tratamientos y mecanismos se realizó por una ANADEVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey. Por otro lado, los datos de latencia de las crisis se analizaron mediante ANADEVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tamhane T2 y, por último, el porcentaje de cada grupo se comparó mediante la  $X^2$  de Pearson contra el grupo de solución salina. Una  $p < 0.05$  fue considerada para la diferencia significativa.

## 7. Resultados

### 7.1 Preparación del extracto acuoso de la parte aérea de *S. circinnata*

La preparación del extracto acuoso de la parte aérea de *S. circinnata* (Fig. 6A) se realizó mediante una decocción, que consistió en colocar el material vegetal en agua, para dejarlo hervir durante 10 minutos. Después, el filtrado se dejó enfriar y se secó mediante un proceso de liofilización (Fig. 3B) para el cálculo del rendimiento y su almacenamiento hasta ser requerido para el análisis químico y biológico (Fig. 6).

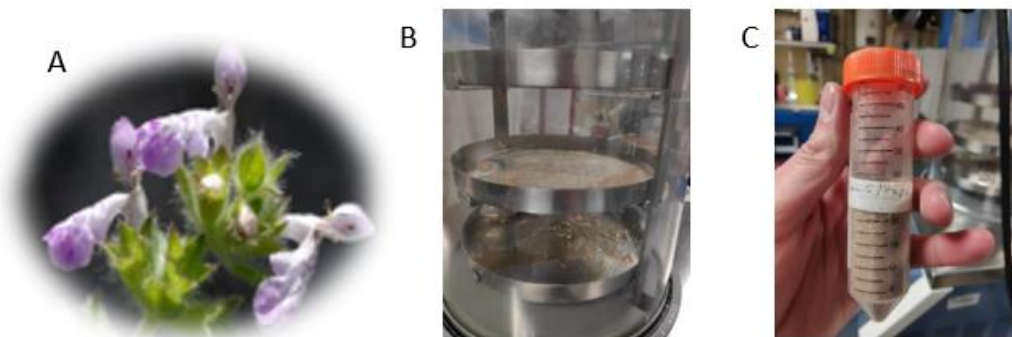


Figura 6. Preparación del extracto acuoso de la parte aérea de *S. circinnata* Planta (A). Proceso de liofilización para secar el líquido filtrado previamente obtenido por decocción (B). Almacenamiento del extracto (C).

### 7.2 Evaluación del perfil cromatográfico del extracto acuoso de *S. circinnata*

La técnica de cromatografía en capa fina se llevó a cabo con diferentes eluyentes y fracciones de extractos (Fig. 7A). Posteriormente se obtuvo un cromatograma de líquidos de alta resolución que permitió identificar varios picos abundantes para una muestra del extracto acuoso de 3 mg/mL. Uno de los picos fue identificado previamente como un diterpeno neoclerodano denominado amarisolida A (Moreno-Pérez et al., 2021) que se observa en el tiempo de retención de 7.02 min (Fig. 7B). Cabe hacer mención que este tipo de compuestos son característicos del género *Salvia*.

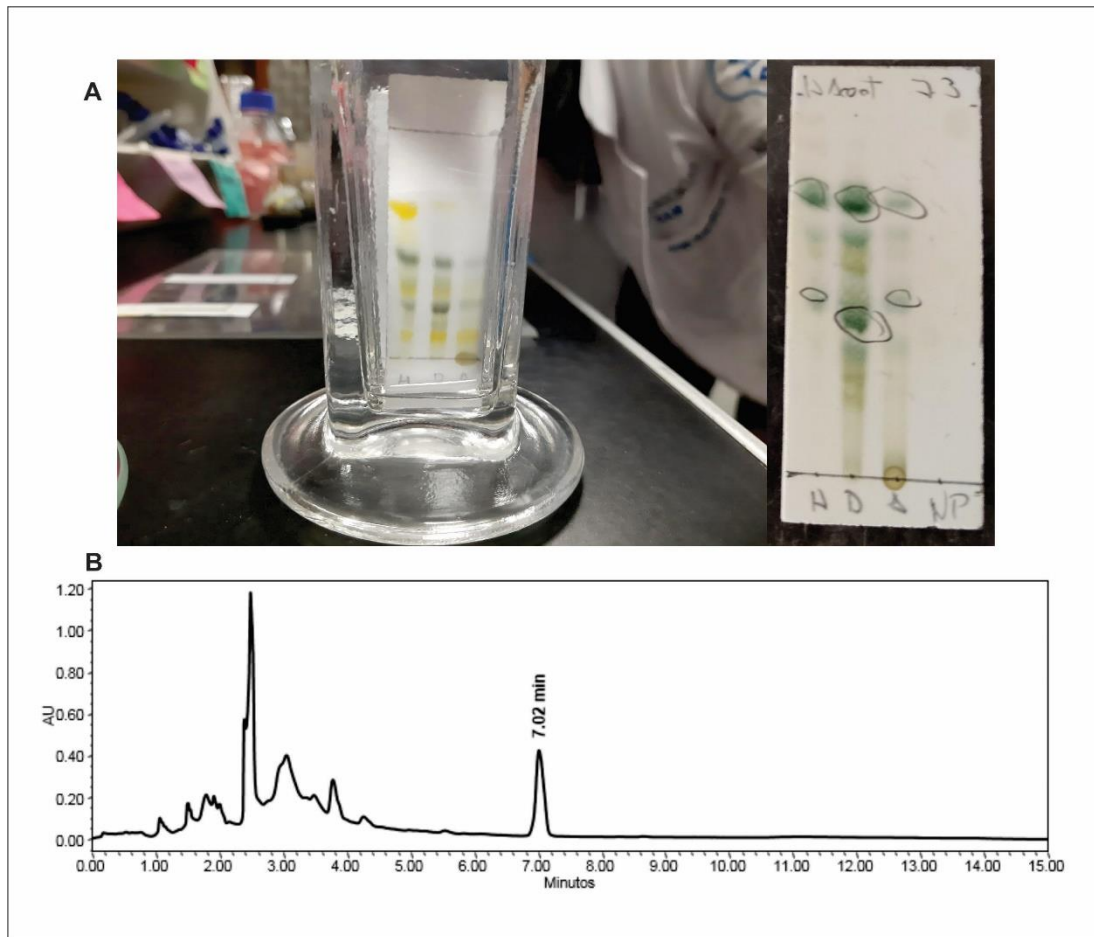


Figura 7. Evaluación del perfil cromatográfico del extracto acuoso de *S. circinnata*. Cromatografía en capa fina con diferentes eluyentes y fracciones de extractos (A). Cromatograma de líquidos de alta resolución para identificar los picos abundantes en una muestra de 3 mg/mL. Se muestra uno de ellos previamente identificado como diterpeno neoclerodano, amarisolida A, en el tiempo de retención de 7.02 minutos (B).

### 7.3 Cirugía estereotáxica para el implante de electrodos

El proceso constó de realizar 84 cirugías estereotáxicas para la implantación de electrodos de registro EEG *in situ* en los lóbulos frontal derecho, frontal izquierdo, parietal derecho, parietal izquierdo y uno en el cerebelo como referencia (Fig. 8A). Esto incluyó la preparación de anestesia con los fármacos correspondientes: ketamina (100 mg/kg) y xilazina (20 mg/kg) mediante administración intraperitoneal. Posteriormente se dejó un periodo de recuperación

postoperatoria de una semana (Fig. 8B).

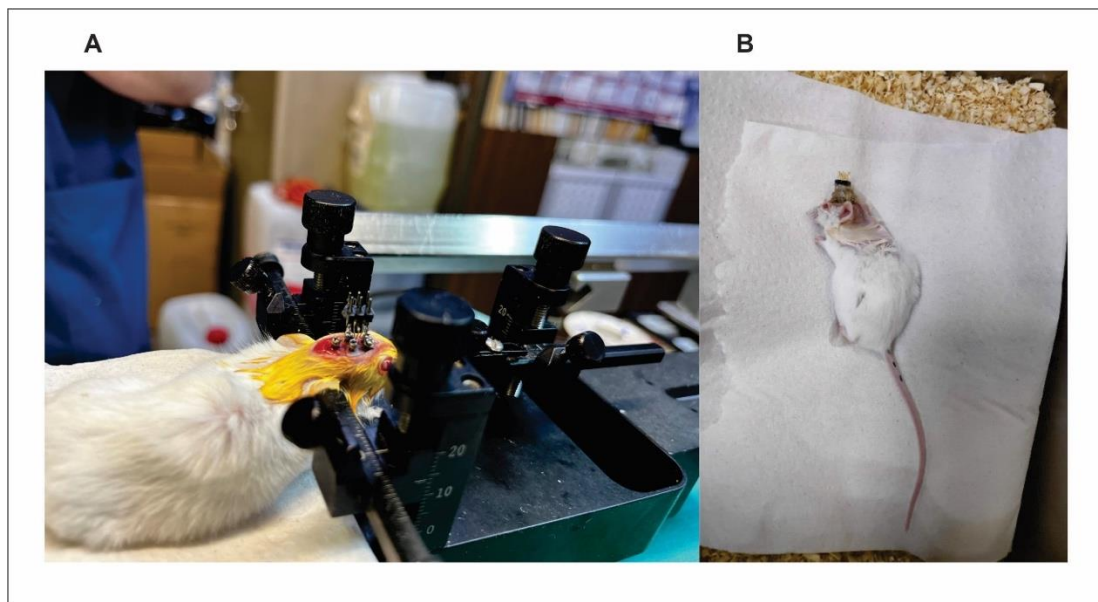


Figura 8. Realización de cirugías estereotáxicas para implantación de electrodos de registro ECoG. Implantación de electrodos de registro en las cortezas frontales, parietales y uno cerebelar de referencia (A). Recuperación postoperatoria de una semana de los ratones implantados (B).

#### **7.4 Evaluación del efecto del extracto acuoso de *S. circinnata* en los parámetros de latencia, incidencia, duración y sobrevivencia en las crisis clónicas y tónico-clónicas inducidas con PTZ en ratones.**

El porcentaje de crisis tónico-clónicas se redujo significativamente en los grupos que recibieron *S. circinnata* en dosis de 1 ó 3 mg/kg ( $X^2(1) = 5.333$ ,  $p < 0.01$ ) (37.5% y 50%, respectivamente), 10 mg/kg y 30 mg/kg ( $X^2(1) = 7.273$ ,  $p < 0.01$ ; para ambas dosis) (37.5% para ambas dosis), así como 100 mg/kg ( $X^2(1) = 9.6$ ,  $p < 0.005$ ) (12.5%) y el fármaco de referencia DZP (1 mg/kg) ( $X^2(1) = 16$ ,  $p < 0.05$ ) (0%) en comparación con el grupo que recibió solución salina (100%) (Fig. 9A).

En el análisis de la latencia, las crisis presentaron un retardo con diferencia estadística ( $F_{8,23.33} = 23.76$ ,  $p \leq 0.01$ ) en los grupos tratados con *S. circinnata* (100 mg/kg, 1705 segundos en promedio) y DZP (1mg/kg, 1800 segundos en promedio) en comparación con el grupo que recibió solución salina (476 segundos en promedio) (Fig. 9B). No hubo cambios estadísticamente significativos en

la duración de las crisis entre los grupos comparados con el control (16 segundos en promedio) (Fig. 9C).

Finalmente, un mayor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo en los animales tratados con DZP (1 mg/kg) ( $X^2(1) = 16, p < 0.005$ ) (100%) y *S. circinnata* [3 mg/kg, 10 mg/kg, y 30 mg/kg ( $X^2(1) = 7.273, p < 0.01$ ) (62.5%), 1 mg/kg ( $X^2(1) = 9.600, p < 0.01$ ) (75%), y 100 mg/kg ( $X^2(1) = 16, p < 0.05$ ) (100%)] en comparación con el grupo que recibió solución salina (0%) (Fig. 9D).

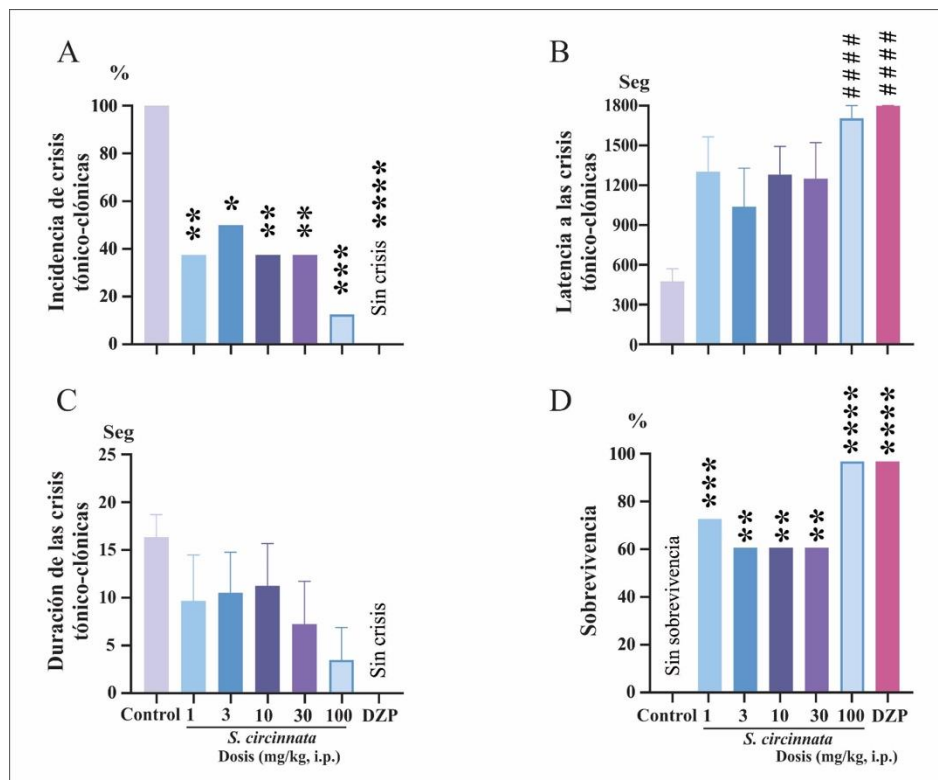


Figura 9. Efectos de *S. circinnata* sobre la incidencia, latencia, duración y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ. Los datos de incidencia indican el porcentaje de ratones que mostraron crisis tónico-clónicas (n=8 por grupo); el porcentaje de cada grupo se comparó estadísticamente mediante la  $X^2$  de Pearson contra el grupo de solución salina. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  en comparación con el control. Los datos de la latencia se expresan como el valor promedio  $\pm$  SEM (n=8) y se analizaron por ANADEVIA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Tamhane T2. #### $p < 0.0001$  en comparación con solución salina.

Respecto a las crisis clónicas, no se presentaron diferencias significativas en la incidencia, latencia o duración entre los tratamientos.



## 7.5 Evaluación del perfil ECoG del extracto acuoso de *S. circinnata*

En el análisis de potencia espectral, el ECoG mostró una relación entre la respuesta al tratamiento farmacológico, el tiempo y las regiones corticales en comparación con la actividad de la línea base (% de la línea base) (Fig. 10).

Ni el vehículo (solución salina) ni el extracto de *S. circinnata* en la dosis más baja (1 mg/kg) produjeron diferencias significativas en las bandas analizadas en la corteza frontal derecha (Fig. 10A y 10B, respectivamente). El extracto (3 mg/kg) produjo disminución significativa en la banda alfa ( $F_{2,10} = 17.369$ ,  $p = 0.001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.019$ ) y 30 ( $p = 0.025$ ), así como aumento en la banda delta ( $F_{2,10} = 12.995$ ,  $p = 0.002$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.0001$ ) (Fig. 10C). En la dosis de 10 mg/kg se produjo aumento en la banda delta ( $F_{2,10} = 9.114$ ,  $p = 0.006$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.012$ ) y 30 ( $p = 0.028$ ), y disminución en la banda alfa ( $F_{2,12} = 14.580$ ,  $p = 0.001$ ) y beta ( $F_{2,10} = 7.268$ ,  $p = 0.011$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.005$ ,  $p = 0.023$ , respectivamente) (Fig. 10D). En la dosis de 30 mg/kg, hubo aumento en la banda delta ( $F_{2,10} = 9.205$ ,  $p = 0.005$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.008$ ) y en theta ( $F_{2,10} = 29.837$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.001$ ), y disminución en alfa ( $F_{2,10} = 17.251$ ,  $p = 0.001$ ) y beta ( $F_{2,10} = 7.442$ ,  $p = 0.01$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.002$ , respectivamente) (Fig. 10E). En la dosis más alta, el extracto (100 mg/kg) disminuyó la banda delta ( $F_{2,10} = 52.007$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.001$ ) y alfa ( $F_{2,12} = 8.245$ ,  $p = 0.006$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.011$ ), y aumentó la banda delta ( $F_{2,10} = 52.007$ ,  $p = 0.0001$ ) y gamma ( $F_{2,10} = 10.568$ ,  $p = 0.003$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.020$ ,  $p = 0.042$ , respectivamente) (Fig. 10F). En el caso de DZP (1 mg/kg), hubo disminución en la banda delta ( $F_{2,10} = 17.821$ ,  $p = 0.001$ ) y theta ( $F_{2,12} = 12.260$ ,  $p = 0.001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.032$ , respectivamente) y 30 ( $p = 0.032$ ,  $p = 0.005$ , respectivamente), y aumento en la banda beta ( $F_{2,10} = 17.768$ ,  $p = 0.001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.003$ ) y 30 ( $p = 0.046$ ) (Fig. 10G).

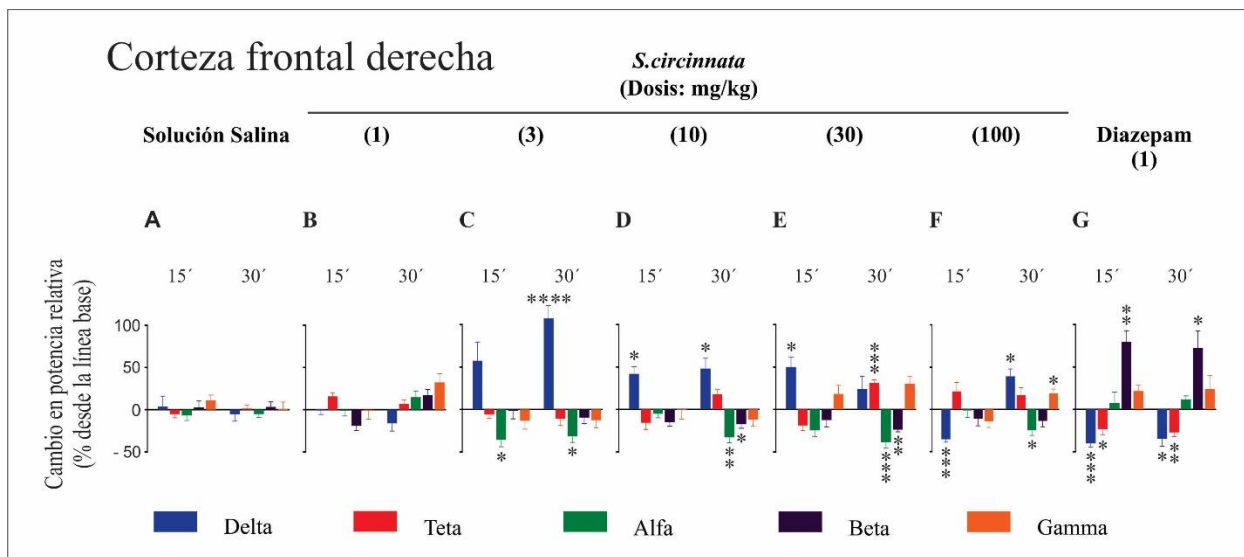


Figura 10. Cambios inducidos por el extracto acuoso de *S. circinnata* (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) sobre la potencia relativa de la corteza frontal del hemisferio derecho a los 15 y 30 min después de la administración de los tratamientos. Nótese las disminuciones en las bandas alfa y beta a partir de la dosis de 3 mg/kg (C-F). Este efecto fue contrario al fármaco de referencia DZP (G). Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar y se analizaron por un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías para medidas repetidas, seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni (n = 6 por grupo). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

En la corteza parietal derecha, la administración de solución salina no provocó diferencia significativa en las bandas analizadas (Fig. 11A). La dosis más baja del extracto (1 mg/kg) aumentó la banda gamma ( $F_{1,122, 5.612} = 7.362$ ,  $p = 0.036$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.016$ ) y 30 ( $p = 0.033$ ), así como en la banda delta ( $F_{2,10} = 21.022$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.012$ ) y alfa ( $F_{2,10} = 24.147$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.006$ ) (Fig. 11B). El extracto (3 mg/kg) produjo disminución en la banda theta ( $F_{1,124,5.619} = 14.825$ ,  $p = 0.009$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.008$ ) y en la banda alfa ( $F_{2,10} = 11.606$ ,  $p = 0.002$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.001$ ), así como aumento en la banda delta ( $F_{2,10} = 12.052$ ,  $p = 0.002$ ) en el minuto 30 (0.0001) (Fig. 11C). En la dosis de 10 mg/kg hubo aumento en la banda theta ( $F_{2,10} = 7.092$ ,  $p = 0.012$ ) y disminución en la banda alfa ( $F_{2,10} = 31.894$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.044$ ,  $p = 0.001$ , respectivamente) (Fig. 11D). En la dosis de 30 mg/kg se encontró aumento en la banda theta ( $F_{2,12} = 29.905$ ,  $p = 0.0001$ ) y gamma ( $F_{2,10} = 4.941$ ,  $p = 0.032$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.004$ ,  $p = 0.01$ , respectivamente), y disminución en alfa ( $F_{2,10} = 6.081$ ,  $p = 0.019$ ) y beta ( $F_{2,10} = 7.714$ ,  $p = 0.009$ ) en el mismo tiempo ( $p = 0.047$ ,  $p = 0.002$ ,

respectivamente) (Fig. 11E). En la dosis más alta, el extracto (100 mg/kg) disminuyó la banda alfa ( $F_{1,124,5,621} = 7.885$ ,  $p = 0.009$ ) a los 15 ( $p = 0.003$ ) y 30 minutos ( $p = 0.049$ ), mientras que se produjo aumento en la banda theta ( $F_{2,10} = 9.571$ ,  $p = 0.005$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.029$ ) y 30 ( $p = 0.041$ ) (Fig. 11F). Por otro lado, el DZP (1 mg/kg) disminuyó las bandas delta ( $F_{2,10} = 11.533$ ,  $p = 0.003$ ) y theta ( $F_{2,10} = 14.584$ ,  $p = 0.001$ ), tanto en el minuto 15 ( $p = 0.029$ ,  $p = 0.004$ , respectivamente) como en el minuto 30 ( $p = 0.046$ ,  $p = 0.03$ , respectivamente), y aumentó la banda beta ( $F_{2,10} = 19.530$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.001$ ) y 30 ( $p = 0.009$ ), así como la banda gamma ( $F_{2,10} = 6.692$ ,  $p = 0.011$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.024$ ) (Fig. 11G).

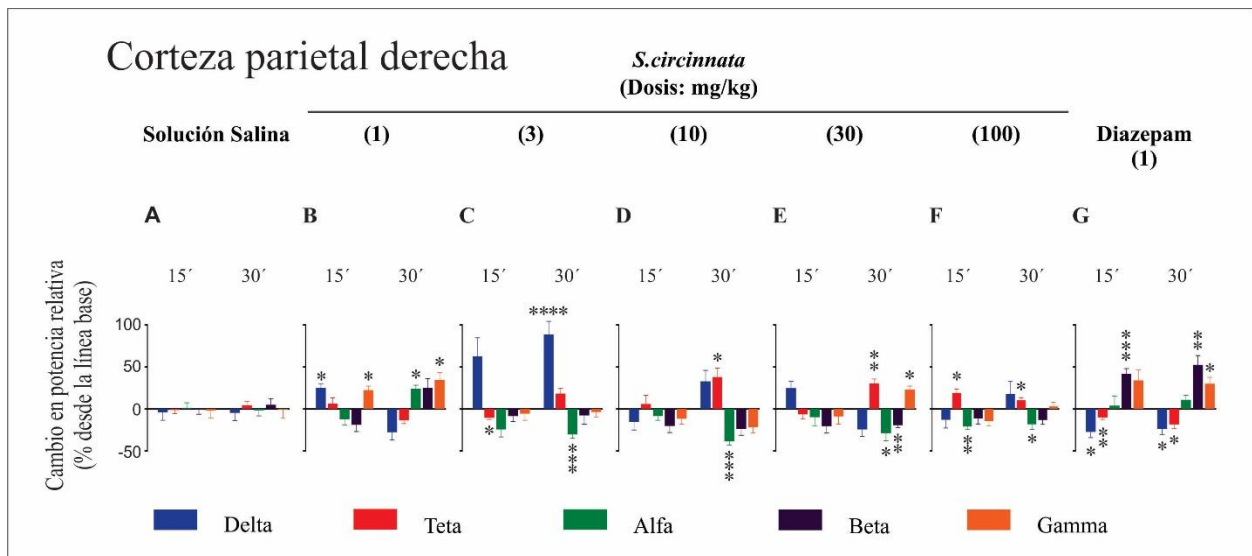


Figura 11. Cambios inducidos por el extracto acuoso de *S. circinnata* (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) sobre la potencia relativa de la corteza parietal del hemisferio derecho 15 y 30 min después de la administración de los tratamientos. Nótese las disminuciones en las bandas alfa y beta a partir de la dosis de 3 mg/kg (C-F). Este efecto fue contrario al fármaco de referencia DZP (G). Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar y se analizaron por un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías para medidas repetidas, seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni ( $n = 6$  por grupo). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

Cabe hacer mención que los cambios en el espectro de potencia del ECoG del hemisferio izquierdo fueron equivalentes a los observados en el hemisferio derecho, tanto en la corteza frontal como en la parietal.

La comparación de la potencia relativa mostró diferencia significativa entre las respuestas al tratamiento farmacológico entre grupos (Fig. 12) en las bandas de frecuencia **delta** (corteza frontal

derecha:  $F_{6, 15.8} = 20.78$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F_{6, 14.99} = 22.09$ ,  $p < 0.0001$ ), **theta** (corteza frontal derecha:  $F_{6, 16.15} = 30.54$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F_{6, 15.3} = 16.64$ ,  $p < 0.0001$ ), **alfa** (corteza frontal derecha:  $F_{6, 15.72} = 18.46$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F_{6, 15.8} = 24.77$ ,  $p < 0.0001$ ), **beta** (corteza frontal derecha:  $F_{6, 15.41} = 10.4$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F_{6, 15.64} = 9.029$ ,  $p < 0.0001$ ) y **gamma** (corteza frontal derecha:  $F_{6, 15.79} = 3.136$ ,  $p = 0.0319$ ; corteza parietal derecha:  $F_{6, 15.89} = 8.403$ ,  $p = 0.0003$ ) (Fig. 12A, B).

Las dosis del extracto acuoso de 3 mg/kg y 10 mg/kg exhibieron mayor proporción de la banda **delta** en la corteza frontal derecha ( $p = 0.0001$ ,  $p = 0.0357$ , respectivamente) en comparación con el grupo de solución salina. En tanto que las dosis de 3 mg/kg ( $p < 0.0001$ ), 10 mg/kg ( $p = 0.0021$ ) y 100 mg/kg ( $p = 0.0018$ ) fueron diferentes con respecto al DZP (Fig. 12A). Por otro lado, hubo aumento con la dosis de 3 mg/kg en comparación con la solución salina ( $p = 0.0003$ ) y el DZP ( $p < 0.0001$ ) en la corteza parietal derecha (Fig. 12B).

En cuanto a la banda **theta**, la dosis de 30 mg/kg generó aumento tanto en la corteza frontal ( $p = 0.0185$ ) como parietal ( $p = 0.0012$ ) derecha con respecto al grupo de solución salina y DZP ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0001$ , respectivamente) (Fig. 12A, B). Además, las dosis de 1 mg/kg ( $p = 0.0002$ ), 10 mg/kg ( $p = 0.0005$ ) y 100 mg/kg ( $p = 0.0019$ ) del extracto exhibieron aumento en la corteza frontal derecha en comparación con el DZP (Fig. 9A). Este aumento también se presentó en la corteza parietal derecha con la administración del extracto en las dosis de 3 mg/kg ( $p = 0.0111$ ), 10 mg/kg ( $p = 0.0169$ ) y 100 mg/kg ( $p = 0.0120$ ) (Fig. 12B).

Por otra parte, todas las dosis del extracto acuoso a partir de 3 mg/kg disminuyeron la banda **alfa** en la corteza frontal derecha con respecto a la administración de solución salina ( $p = 0.0093$ ,  $p = 0.0145$ ,  $p = 0.0014$ ,  $p = 0.0440$ , respectivamente) y el DZP ( $p = 0.0011$ ,  $p = 0.0015$ ,  $p = 0.0002$ ,  $p = 0.0040$ , respectivamente) (Fig. 12A). Esto se observó también en la corteza parietal derecha

con las dosis de extracto de 3 mg/kg ( $p = 0.0118$ ) y 10 mg/kg ( $p = 0.0069$ ) en comparación con el grupo con solución salina. Las mismas respuestas se observaron con DZP y el extracto en la corteza frontal derecha ( $p = 0.0007$ ,  $p = 0.0004$ ,  $p = 0.0345$ ,  $p = 0.0288$ , respectivamente) (Fig. 12B).

En la banda **beta**, las dosis de extracto de 10 mg/kg ( $p = 0.0415$ ) y 30 mg/kg ( $p = 0.0335$ ) mostraron diferencia estadística en comparación con el DZP, y la dosis de 30 mg/kg ( $p = 0.0123$ ) con el grupo de solución salina en la corteza frontal derecha (Fig. 12A). En tanto que hubo disminución en todas las dosis del extracto en comparación con DZP ( $p = 0.0371$ ,  $p = 0.0251$ ,  $p = 0.0023$ ,  $p = 0.0033$ ,  $p = 0.0061$ ) y en la dosis de extracto de 30 mg/kg en comparación con la solución salina ( $p = 0.0076$ ) en la corteza parietal derecha (Fig. 12B).

Por último, la banda **gamma** presentó menor proporción con las dosis de 3 mg/kg ( $p = 0.008$ ) y 10 mg/kg ( $p = 0.006$ ) con respecto al DZP en la corteza parietal derecha (Fig. 12B).

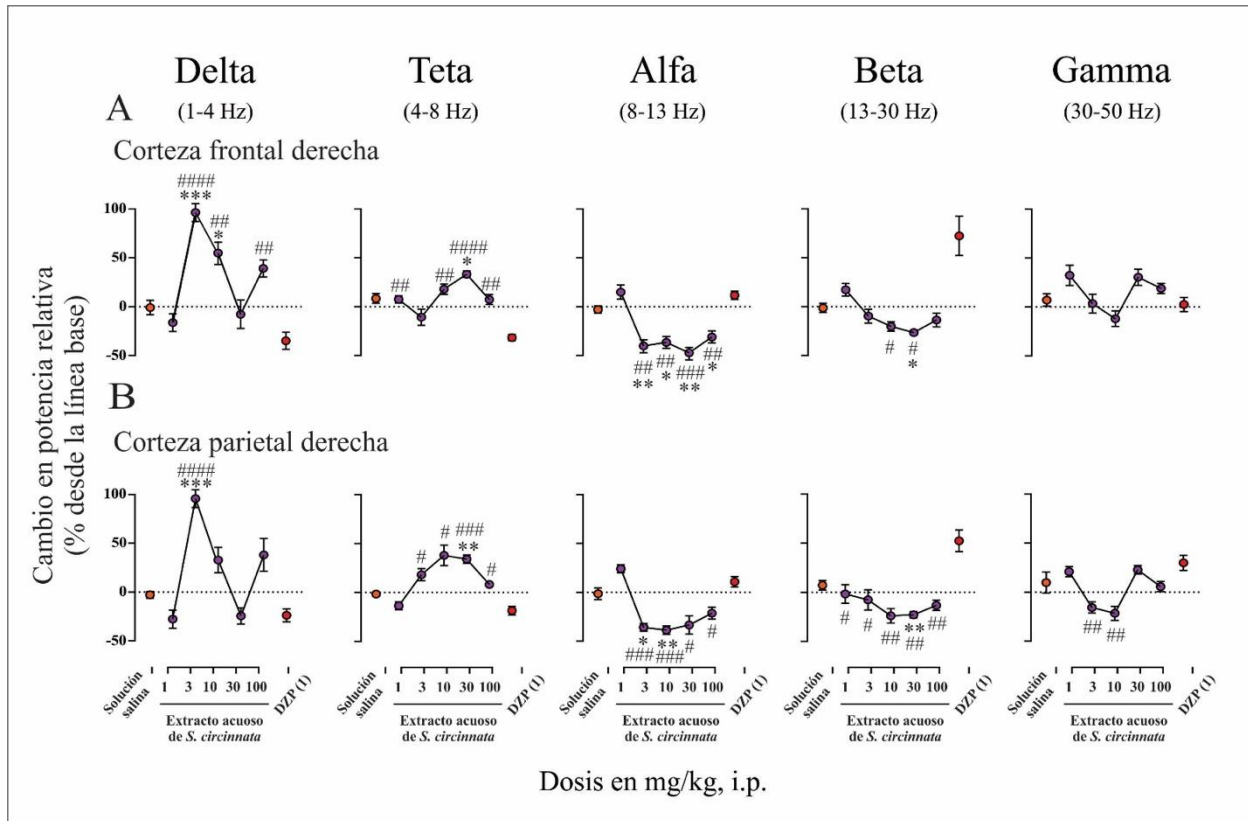


Figura 12. Comparación entre las diferentes dosis del extracto acuoso de *S.circinnata* del efecto sobre la potencia relativa. La dosis de 3 mg/kg mostró un aumento significativo en la banda delta en la corteza frontal y parietal derecha con respecto a la solución salina y el DZP (A, B; primer panel). De igual manera, en la banda theta se presentó un aumento en ambas cortezas para casi todas las dosis en comparación con el DZP (A, B; segundo panel). Por otro lado, tanto en la banda de frecuencia alfa como en la banda beta, existió una disminución significativa con respecto al DZP en la corteza frontal derecha y parietal derecha (A, B; tercer y cuarto panel). Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar y se analizaron por un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (n = 6 por grupo). \*p < 0.05, \*\*p < 0.001, \*\*\*p < 0.005 contra la solución salina y #p < 0.05, ##p < 0.001, ###p < 0.005, ####p < 0.0001 contra DZP.

## **7.6 Evaluación del efecto de amarisolida A en la incidencia, latencia, duración y sobrevivencia en las crisis clónicas y tónico-clónicas en ratones.**

La presencia de amarisolida A redujo la incidencia de las crisis tónico-clónicas en la dosis de 0.05 mg/kg ( $X^2(1) = 5.333$ , p<0.05) (50%) y 1 mg/kg ( $X^2(1) = 9.6$ , p<0.0001) (12.5%) en comparación con el grupo de solución salina (100%) (Fig. 13A).

En la latencia se observó que el grupo tratado con amarisolida A en la dosis de 1 mg/kg (p<0.01) produjo aumento significativo ( $F_{8,23.33} = 23.76$ ) (1733 segundos en promedio) en comparación con el grupo solución salina (476 segundos en promedio) (Fig. 11B). No se encontraron cambios en la duración de las crisis tónico-clónicas (Fig. 13C).

Mientras que, en la sobrevivencia, ambas dosis de amarisolida A, 0.05 mg/kg y 1 mg/kg ( $X^2(1) = 5.33$ , p<0.05;  $X^2(1) = 12.444$ , p<0.0001; respectivamente) produjeron mayor porcentaje (50% y 87.5%, respectivamente) en comparación con el grupo vehículo (0%) (Fig. 13D).

No se encontraron cambios en la latencia, incidencia o duración de las crisis clónicas.

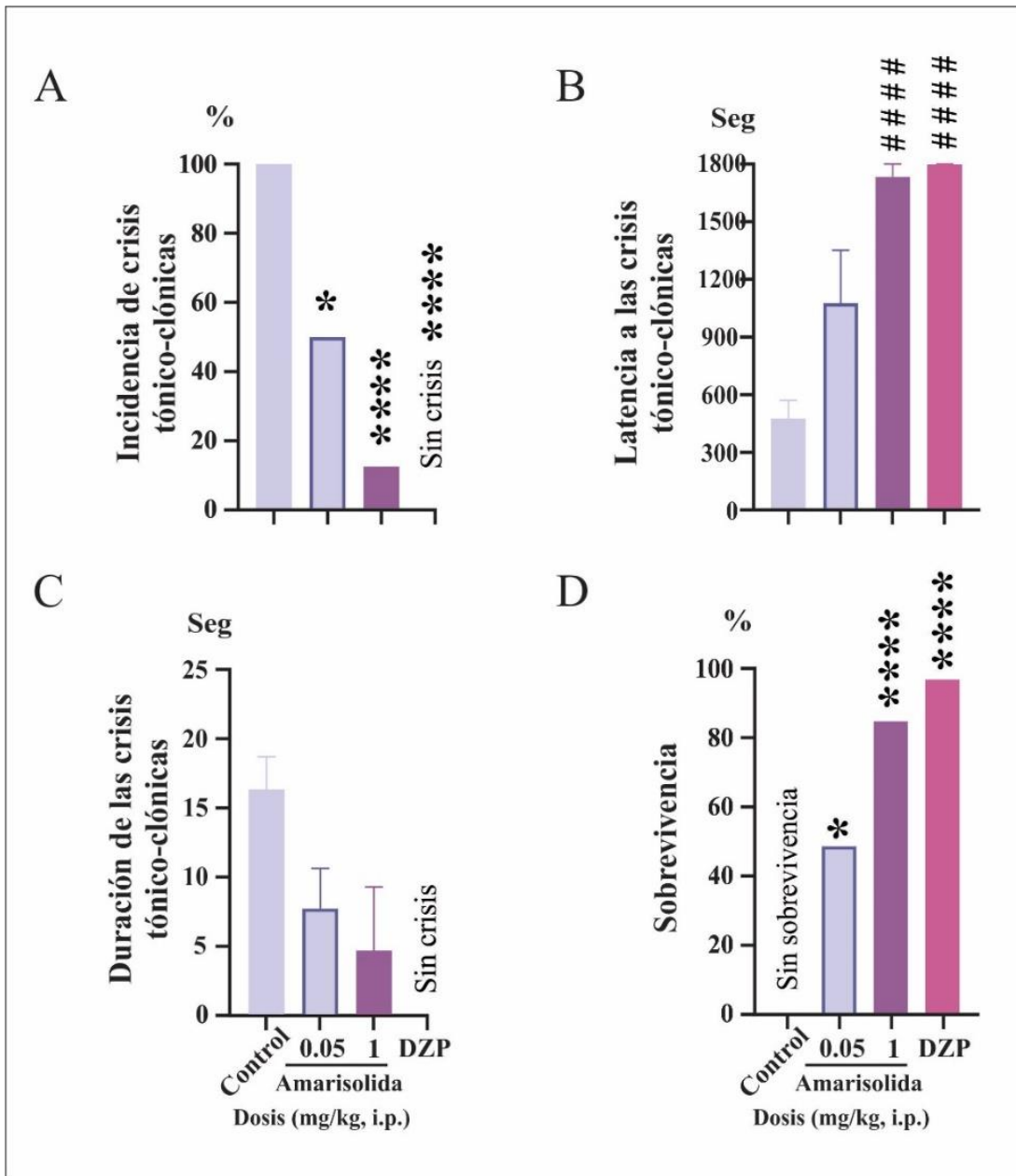


Figura 13. Efectos de amarisolid A sobre la incidencia, latencia, duración y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ en ratones. Los datos de incidencia indican el porcentaje de ratones que mostraron crisis tónico-clónicas (n=8 por grupo); el porcentaje de cada grupo se comparó estadísticamente mediante la  $\chi^2$  de Pearson contra el grupo de solución salina. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  en comparación con el control. Los datos de la latencia se expresan como el valor promedio  $\pm$  E.E.M (n=8) y se analizaron por ANADEVVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Tamhane T2. ##### $p < 0.0001$  en comparación con solución salina.

### 7.7 Evaluación del perfil ECoG de amarisolid A.

En el análisis espectral ECoG de la corteza frontal derecha, los grupos tratados con amarisolid A (1 mg/kg) mostraron disminución en la banda **delta** ( $F_{2,10} = 5.738$ ,  $p = 0.022$ ) en el minuto 15 (p

= 0.037) y en **alfa** ( $F_{2,10} = 10.419$ ,  $p = 0.004$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.018$ ), así como aumento en la banda **theta** ( $F_{2,10} = 7.418$ ,  $p = 0.010$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.039$ ) (Fig. 14O).

En la corteza parietal derecha, la misma dosis de amarisolidida A provocó disminución en la banda **delta** ( $F_{2,8} = 25.304$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.005$ ) y 30 ( $p = 0.008$ ) y aumento en la banda **theta** ( $F_{2,10} = 4.544$ ,  $p = 0.039$ ) en el minuto 15 ( $p = 0.03$ ) y en **gamma** ( $F_{2,10} = 33.387$ ,  $p = 0.0001$ ) en el minuto 30 ( $p = 0.006$ ) (Fig. 14P).

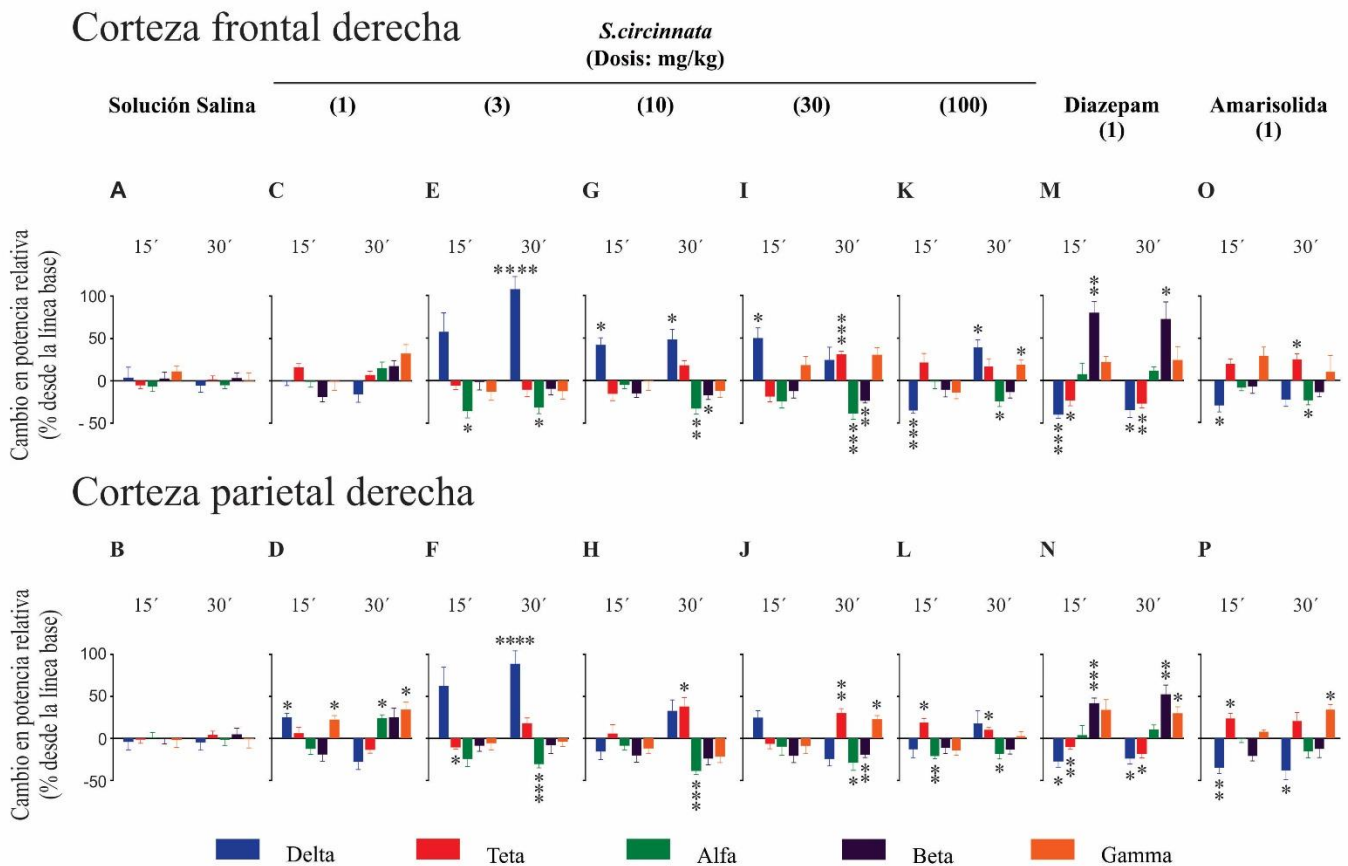


Figura 14. Cambios inducidos por el extracto acuoso de *S.circinnata* (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) y amarisolidida A (1 mg/kg) sobre la potencia relativa de la cortezas frontal y parietal del hemisferio derecho 15 y 30 minutos tras la administración de los tratamientos. Nótese las disminuciones en la banda alfa con la amarisolidida A en la corteza frontal (O). Este efecto presenta una tendencia contraria al fármaco de referencia DZP (M, N). Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar y se analizaron por un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías para medidas repetidas, seguida de una prueba *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 6$  por grupo). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .



En el hemisferio izquierdo, los efectos producidos por los diferentes tratamientos fueron equivalentes al espectro de potencia ECoG del hemisferio derecho para ambas cortezas (Fig. 15).

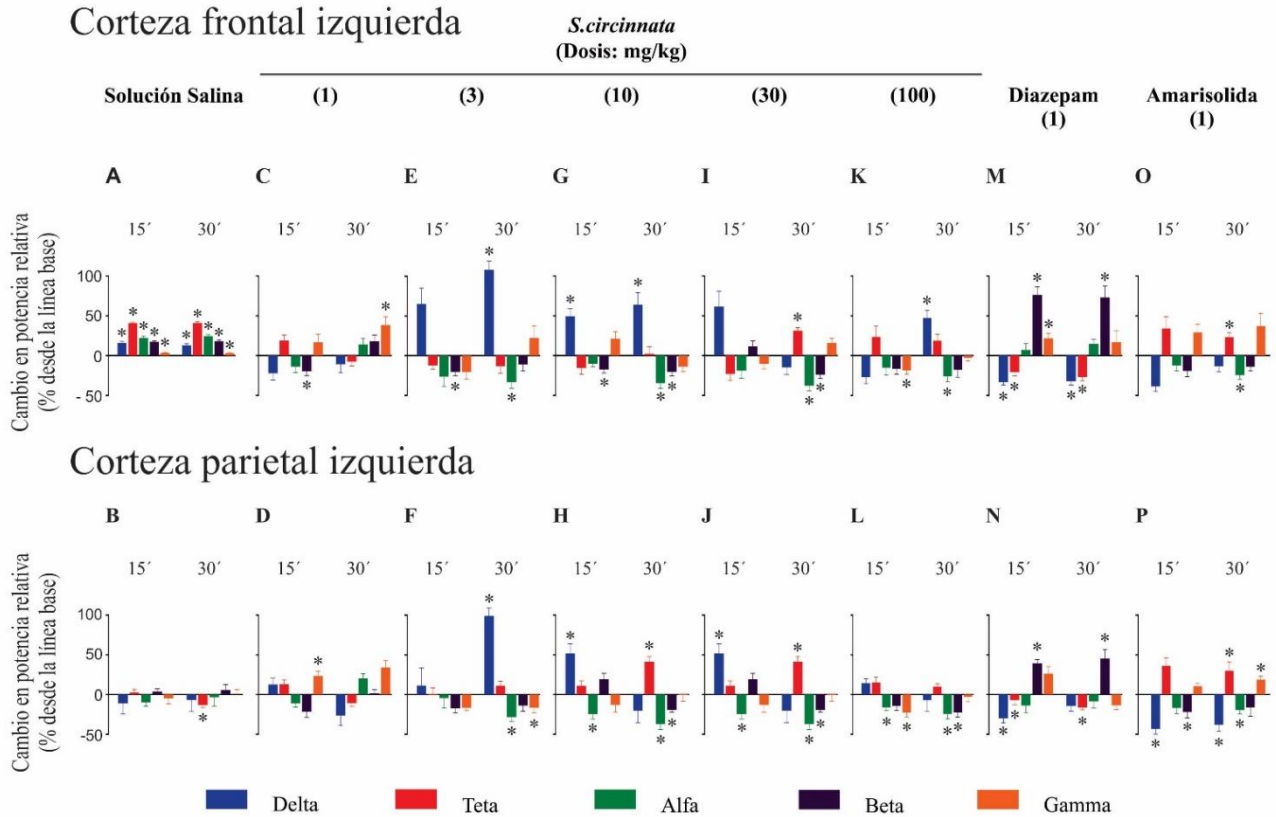


Figura 15. Cambios inducidos por el extracto acuoso de *S.circinnata* (1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg) y amarisolida A (1 mg/kg) sobre la potencia relativa de la cortezas frontal y parietal del hemisferio izquierdo 15 y 30 minutos tras la administración de los tratamientos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar y se analizaron por un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías para medidas repetidas, seguida de una prueba *post-hoc* de Bonferroni ( $n = 6$  por grupo). \* $p \leq 0.05$ .

### 7.8 Evaluación de la participación de los receptores inhibidores GABA<sub>A</sub> ó 5-HT<sub>1A</sub> en la actividad anticonvulsiva y del perfil ECoG de amarisolida A.

La inhibición de los receptores GABA<sub>A</sub> se evaluó en presencia del antagonista PCT (1 mg/kg), así como de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> con el antagonista WAY-100135 (1 mg/kg). Para ello, la actividad anticonvulsiva de amarisolida A (1 mg/kg) se comparó con la respuesta de los ratones que recibieron solución salina, DZP y el 8-OHDPAT como agonistas de dichos receptores, respectivamente (Fig. 16).

No se encontraron diferencias en la incidencia de las crisis tónico-clónicas con el grupo de PCT (1 mg/kg) + amarisolida A (1 mg/kg) (37.5% de incidencia) o WAY (1 mg/kg) + amarisolida A (25%) con respecto al grupo de amarisolida A (1 mg/kg) (12.5%). Asimismo, el grupo tratado con 8-OHDPAT (1 mg/kg) (80%) no mostró diferencias en comparación con el grupo de solución salina (100%) (Fig. 16A).

En la latencia no se presentaron diferencias con ninguno de los antagonistas en conjunto con amarisolida A (1376 segundos en promedio para PCT + amarisolida A y 1517 segundos en promedio para WAY + amarisolida A) comparado con el grupo tratado sólo con amarisolida A (1733 segundos en promedio). 8-OHDPAT tampoco produjo cambios (935 segundos en promedio) en comparación con el grupo control de solución salina (476 segundos en promedio) (Fig. 16B).

No se encontraron cambios en la duración de las crisis tónico-clónicas (Fig. 16C).

Por último, en la sobrevivencia, no hubo diferencias con el grupo de PCT (1 mg/kg) + amarisolida A (1 mg/kg) (75%) o WAY (1 mg/kg) + amarisolida A (87.5%) en comparación con el grupo de amarisolida A (1 mg/kg) (87.5%). De igual manera, el grupo tratado con 8-OHDPAT (1 mg/kg) (12%) no mostró diferencias con respecto al grupo de solución salina (0%) (Fig. 16D).

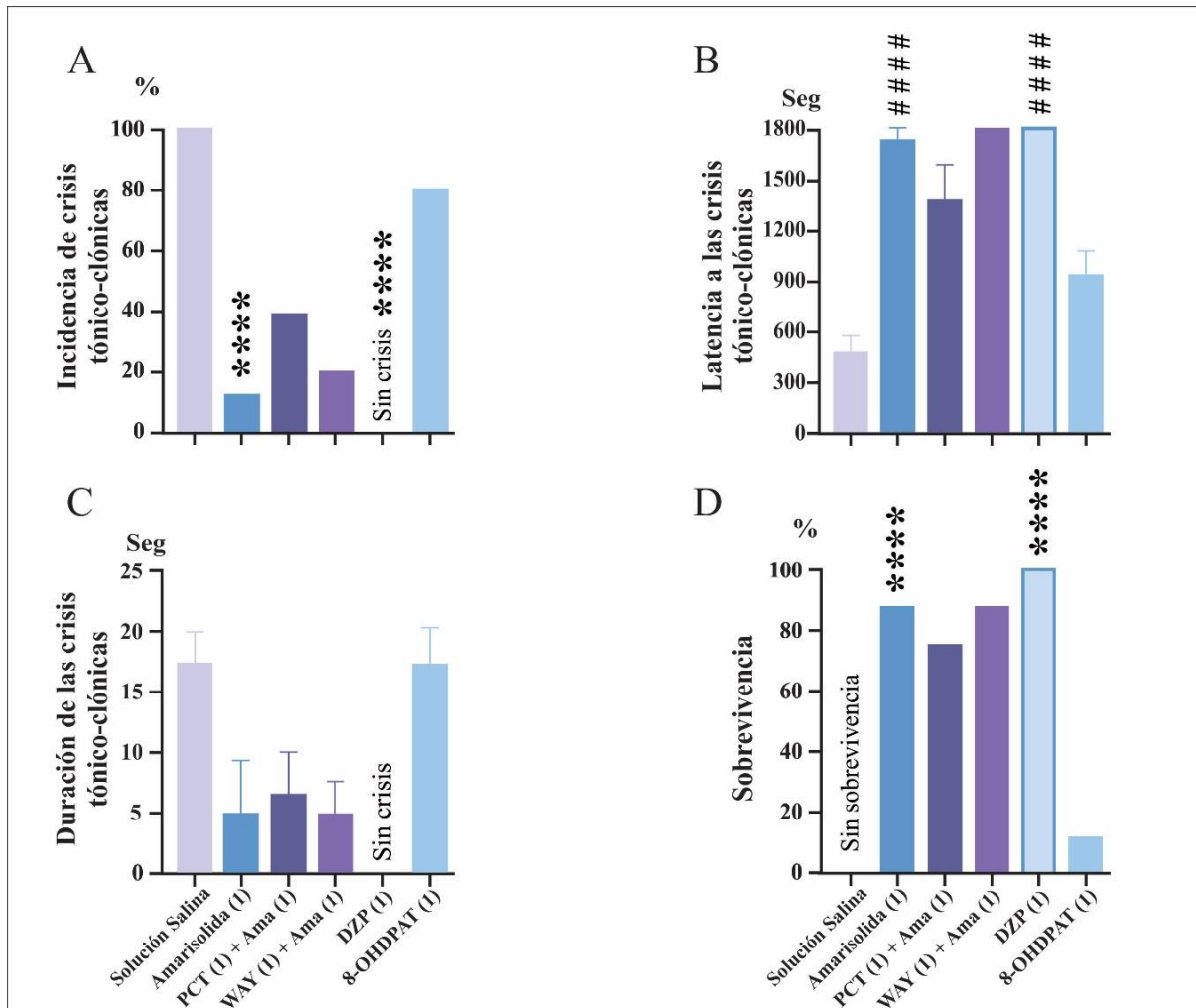


Figura 16. Efectos de amarisolid A en conjunto con los antagonistas PCT y WAY sobre la incidencia, latencia, duración y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ en ratones. Los datos de incidencia indican el porcentaje de ratones que mostraron crisis tónico-clónicas (n=8 por grupo). El porcentaje de cada grupo se comparó estadísticamente mediante la  $\chi^2$  de Pearson contra el grupo de solución salina y contra amarisolid A para el caso de los antagonistas. \*\*\*\*p<0.0001 en comparación con el control. Los datos de la latencia se expresan como el valor promedio  $\pm$  E.E.M (n=8) y se analizaron por ANADEV A de una vía seguida de una prueba post-hoc de Tamhane T2. ####p<0.0001 en comparación con solución salina.

La potencia relativa entre los grupos tratados mostró diferencias significativas (Fig. 17) en las bandas **delta** (corteza frontal derecha:  $F = 6.318$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F = 7.761$ ,  $p < 0.0001$ ), **theta** (corteza frontal derecha:  $F_{7, 18.78} = 6.839$ ,  $p < 0.0004$ ; corteza parietal derecha:  $F_{7, 18.55} = 4.377$ ,  $p < 0.0051$ ), **alfa** (corteza frontal derecha:  $F = 17.85$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F = 6.619$ ,  $p < 0.0001$ ), **beta** (corteza frontal derecha:  $F = 10.32$ ,  $p < 0.0001$ ; corteza

parietal derecha:  $F = 9.054$ ,  $p < 0.0001$ ) y **gamma** (corteza frontal derecha:  $F = 5.587$ ,  $p = 0.0001$ ; corteza parietal derecha:  $F = 7.439$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 17A, B).

La combinación PCT + amarisolida A exhibió aumento en la banda **delta** en la corteza frontal derecha ( $p = 0.0021$ ) en comparación con amarisolida A sola, mientras que con el 8-OHDPAT hubo aumento con respecto a DZP ( $p = 0.0429$ ) (Fig. 17A). En la corteza parietal derecha hubo disminución con respecto al 8-OHDPAT ( $p < 0.0001$ ) y aumento con 8-OHDPAT en comparación con solución salina ( $p = 0.0308$ ) y DZP ( $p = 0.0011$ ) (Fig. 17B).

En la banda **theta**, tanto en la corteza frontal derecha como en la parietal derecha, DZP generó disminución con respecto a la solución salina ( $p = 0.0258$ ,  $p = 0.0298$ , respectivamente) (Fig. 17A, B). En esta banda, amarisolida A y 8-OHDPAT exhibieron aumento con respecto a DZP en la corteza frontal derecha ( $p = 0.0017$ ,  $p = 0.0052$ , respectivamente) (Fig. 17A).

Por otra parte, en la banda **alfa** se presentaron disminuciones en la corteza frontal derecha con amarisolida A ( $p = 0.0010$ ), PCT + DZP ( $p < 0.0001$ ) y 8-OHDPAT ( $p < 0.0001$ ) en comparación con DZP y solución salina para el caso de 8-OHDPAT ( $p = 0.0225$ ). Este efecto fue contrario para el caso de WAY + amarisolida A con respecto a amarisolida A sola ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 17A). En la corteza parietal derecha se observaron efectos equivalentes sobre esta banda; disminución con amarisolida A ( $p = 0.0419$ ), PCT + DZP ( $p = 0.0428$ ), y 8-OHDPAT ( $p = 0.0005$ ) con respecto a DZP, o solución salina con 8-OHDPAT ( $p = 0.0093$ ). WAY + amarisolida A exhibió un aumento con respecto a amarisolida A ( $p = 0.0108$ ) y con WAY + 8-OHDPAT contra 8-OHDPAT ( $p = 0.0191$ ) (Fig. 17B).

En la banda **beta** hubo aumento con el DZP con respecto a la solución salina en la corteza frontal derecha ( $p < 0.0001$ ) y parietal derecha ( $p = 0.0008$ ). PCT + DZP mostró un efecto contrario al del DZP sólo en ambas cortezas ( $p = 0.0023$ ,  $p = 0.0452$ , respectivamente). Amarisolida A y 8-

OHDPAT generaron disminución en comparación con DZP en la corteza frontal derecha ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0001$ , respectivamente) y parietal derecha ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ , respectivamente) (Fig. 17A, B).

Por último, la banda **gamma** presentó diferencias sólo en la corteza parietal derecha, con amarisolida A hubo aumento con respecto a solución salina ( $p = 0.0459$ ) y con WAY + amarisolida A se revirtió ese efecto ( $p = 0.0129$ ) (Fig. 17B).

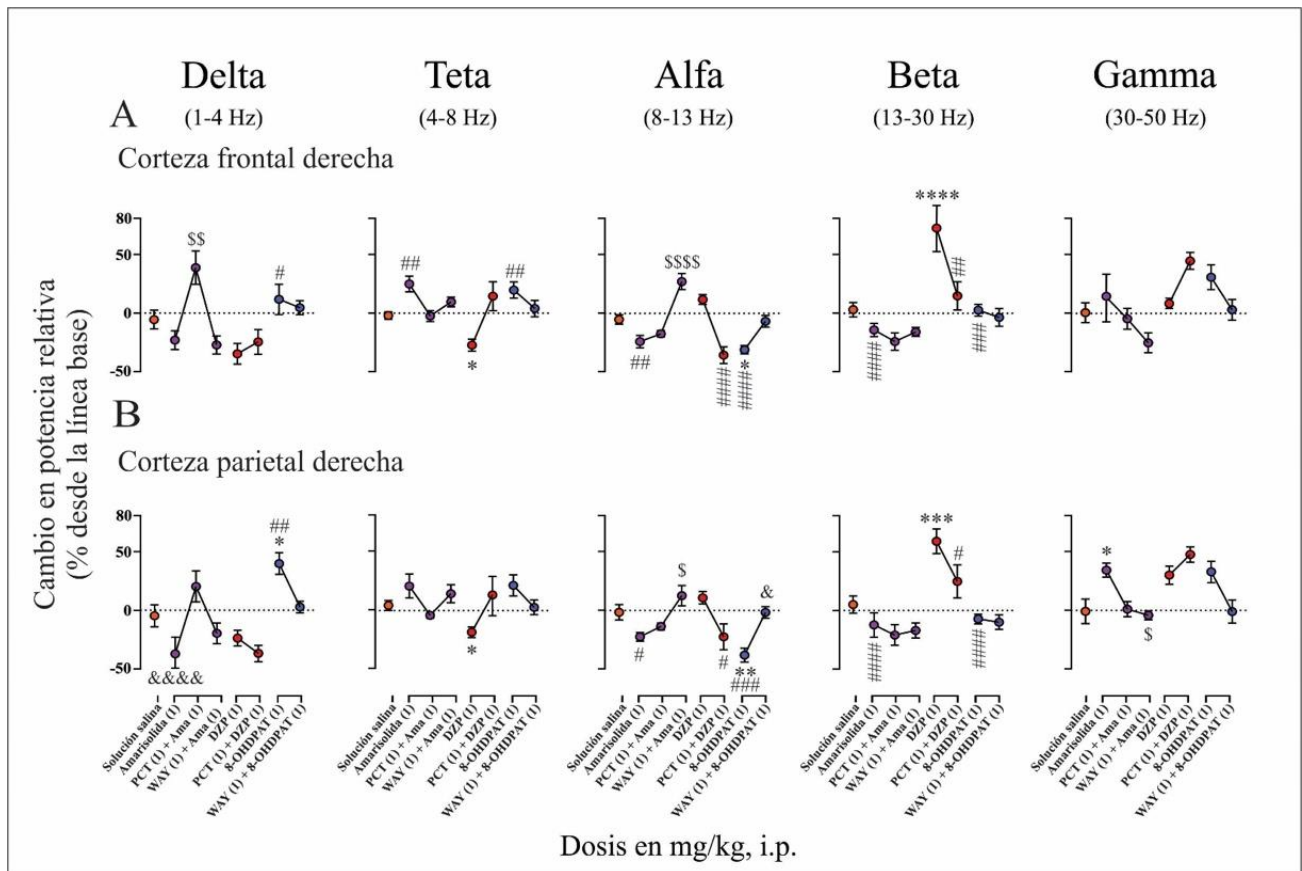


Figura 17. Comparación del efecto de amarisolida A en conjunto con PCT y WAY sobre la potencia relativa. Amarisolida A exhibió disminución vs. 8-OHDPAT en la corteza parietal derecha y PCT + amarisolida A mostró aumento vs. amarisolida A en delta en la corteza frontal derecha (A, B; primer panel). Por otro lado, tanto en la banda alfa como en la banda beta hubo disminución significativa con amarisolida A vs. DZP en la corteza frontal y parietal derecha. La disminución en alfa fue revertida por WAY + amarisolida A (A, B; tercer y cuarto panel). Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar y se analizaron por un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ( $n = 6$  por grupo). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  contra la solución salina; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.005$ , #### $p < 0.0001$  contra DZP; & $p < 0.05$ , &&& $p < 0.0001$  contra 8-OHDPAT; \$ $p < 0.05$ , \$\$\$ $p < 0.001$ , \$\$\$\$ $p < 0.0001$  contra amarisolida A.

## 8. Discusión

En el presente proyecto de tesis se realizó la evaluación neurofarmacológica y ECoG del extracto acuoso de *S. circinnata* y uno de sus metabolitos activos más abundantes, amarisolida A, en ratones con la finalidad de dar evidencia científica que permita conocer su potencial neuroprotector sobre el SNC para inhibir la actividad paroxística inducida durante las crisis convulsivas.

Si bien no han sido reportados muchos estudios sobre los efectos anticonvulsivos de especies de *Salvias*, sí existen algunos reportes tanto a nivel químico como farmacológico de sus propiedades como depresores del SNC al producir efectos ansiolíticos y antinociceptivos. En tanto que, respecto a la actividad anticonvulsiva, se ha descrito que el extracto etanólico y acuoso de *S. haematodes* en dosis 1 g/kg disminuyen la duración de las fases clónicas ( $1.25 \pm 0.32$  segundos) y de extensión tónicas ( $8.17 \pm 0.32$  segundos) de las crisis producidas por electrochoque en ratones (Akbar et al., 1984; 1985). Asimismo, el extracto acuoso de la hoja y el extracto etanólico de la semilla de *S. leriifolia* produjeron mayor latencia en el inicio de las crisis convulsivas en la prueba de metrazol (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006). Por su parte, el pretratamiento con el extracto etanólico de *S. verticillata* generó efecto protector contra la incidencia de las crisis inducidas por PTZ de manera dosis dependiente. La administración con 125, 250, 500, 1000 y 2000 mg/kg produjo 20%, 40%, 50%, 80% y 100% de protección, respectivamente (Naderi et al., 2011).

De manera similar, el extracto acuoso de *S. circinnata* produjo efecto protector contra la incidencia, latencia y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas en forma equivalente entre las dosis de 3, 10, y 30 mg/kg; y con mayor efectividad en la dosis de 100 mg/kg y de 1 mg/kg para amarisolida A.

En cuanto a los cambios relacionados con las bandas de frecuencia del EEG, en dos modelos de epilepsia de ausencia se encontró una correlación inversa de los cambios en la potencia de la

banda gamma con la respuesta a diferentes FACs como etosuximida y 4-aminopiridina. De esta manera, los FACs que aumentaron la potencia de la banda gamma disminuyeron las crisis y los que la disminuyeron exacerbaron las crisis (Maheshwari et al., 2015). Asimismo, la banda gamma —que se piensa que puede relacionarse con la mejora en el procesamiento de información— se ha visto asociada con la función de las interneuronas que expresan parvalbúmina de disparo rápido (Sohal et al., 2009) y la banda theta con la función de las interneuronas hipocampales que expresan parvalbúmina (Amilhon et al., 2015). En general, se ha visto que las oscilaciones cerebrales como delta, theta, alfa y gamma están relacionadas con funciones sensoriales y cognitivas, particularmente tomando un papel importante en la comunicación funcional cerebral en procesos mnésicos e integradores (Basar et al., 2001). En cuanto a la banda beta, estas oscilaciones se han visto implicadas en la codificación de la memoria de asociaciones entre objetos y ubicaciones, específicamente en la región CA1 del hipocampo de ratón (Iwasaki et al., 2021).

Diferentes estudios han reportado el aumento en la actividad beta y la toxicidad relacionada con el enlentecimiento del EEG con el uso de distintos FACs, incluyendo DZP, zolpidem, clonazepam, fenitoína y fenobarbital (Schmidt, 1982; van Lier et al., 2004). Generalmente se ha encontrado que los efectos más comunes de los FACs sobre el EEG son enlentecimiento, reflejado por un aumento en la frecuencia delta y theta, y una disminución en rangos de frecuencia más altos, particularmente enlentecimiento del ritmo dominante (Höller et al., 2018). De igual manera, los FACs que actúan mediante el bloqueo de canales de sodio o calcio exhiben efectos de enlentecimiento del EEG. Por ejemplo, se ha reportado que gabapentina aumenta la actividad delta y theta y disminuye la banda alfa (Saletu et al., 1986). Por su parte, se ha visto que carbamazepina aumenta la actividad theta, oxcarbazepina y carbamazepina disminuyen la frecuencia alfa media y lamotrigina aumenta la actividad de dicha banda (Höller et al., 2018). Asimismo, se ha

documentado que valproato produce una disminución en la banda de frecuencia beta (Sannita et al., 1993; Wu & Xiao, 1997).

En este sentido, diferentes dosis del extracto acuoso de *S. circinnata* presentaron similitudes con los FACs mencionados previamente. En relación con el enlentecimiento del EEG, se observó un aumento en las bandas delta y theta para las dosis de 3, 10 y 100 mg/kg. La dosis de 30 mg/kg también presentó ese aumento en theta, mientras que la dosis de 3 mg/kg no mostró tal incremento. Además, hubo una disminución de manera casi dosis dependiente en las bandas alfa— similar a lo encontrado con gabapentina, oxcarbazepina y carbamazepina— y beta, parecido a lo reportado con valproato. Amarisolida A también aumentó la actividad en la banda theta y disminuyó la actividad en alfa y beta. Asimismo, aumentó la actividad en la banda de frecuencia gamma, como lo sucedido con etosuximida y 4-aminopiridina.

Previamente se ha reportado que el PTZ se acopla al receptor GABA<sub>A</sub> como antagonista no competitivo y podría producir su acción convulsiva mediante el complejo GABA-benzodiazepina-ionóforo de cloruro (Squires et al., 1984). Debido a la acción anticonvulsiva que amarisolida A mostró en este estudio, la primera aproximación para explorar el mecanismo de acción del compuesto fue a través del receptor GABA<sub>A</sub>. Por otro lado, el sistema serotoninérgico también se ha visto implicado como modulador en la epilepsia. En general, en ratones KO de receptores como 5-HT<sub>1A</sub> se ha visto un menor umbral a las crisis convulsivas y los fármacos que elevan los niveles de serotonina disminuyen las crisis; también se ha sugerido una interacción entre serotonina y GABA (Deidda et al., 2021). Asimismo, se ha visto que el agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT, disminuye la potencia de la banda de frecuencia alfa a 10 Hz de la descarga del nervio simpático. Este efecto inhibitor es revertido utilizando el antagonista WAY (Orer et al., 1996). Por último, mediante acoplamiento molecular se ha mostrado que existe un rango de valores



energía de unión de entre -8.1 y -7.2 kcal/mol para amarisolida A en el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, donde la mejor ubicación de unión tuvo un valor de -8.1 kcal/mol y 22 contactos de aminoácidos (Moreno-Pérez et al., 2022). De esta manera, también se evaluó la participación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la acción anticonvulsiva de amarisolida A.

En cuanto a la participación del receptor GABA<sub>A</sub> en la actividad anticonvulsiva y el perfil ECoG de amarisolida A, únicamente se observó una tendencia de PCT a revertir el efecto del metabolito activo en la incidencia, latencia y sobrevivencia en las crisis tónico-clónicas. En la potencia relativa, la PCT revirtió la disminución que se presentaba sólo con amarisolida A en delta y mostró una tendencia a revertir el aumento en theta, mientras que la disminución en beta no tuvo cambios. Por su parte, el antagonista WAY no tuvo efecto sobre las crisis tónico-clónicas, pero revirtió el efecto de inhibición sobre la banda de frecuencia beta que presentaba amarisolida A. Esto fue consistente con la disminución producida por 8-OHDPAT que se había reportado previamente y que se replicó en este estudio. De igual manera, WAY bloqueó el aumento presentado en la banda gamma con la amarisolida A.

## 9. Conclusiones

En este estudio, el efecto neuroprotector del extracto acuoso de *Salvia circinnata* se evaluó en un modelo murino de convulsiones inducidas con pentilentetrazol. El extracto mostró efecto neuroprotector de manera dosis dependiente en la incidencia, latencia y sobrevivencia de las crisis tónico-clónicas. La dosis de 1 mg/kg de amarisolida A también mostró este efecto sugiriendo que está involucrada como compuesto bioactivo. A pesar de que amarisolida A tiene similitudes en el perfil EcoG con el agonista de 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OHDPAT, particularmente en la disminución de la banda alfa, y con FACs como gabapentina, valproato o etosuximida, el efecto anticonvulsivo mostrado por amarisolida A no fue revertido por los antagonistas PCT y WAY. Esto sugiere que otros

posibles mecanismos de acción están involucrados en la protección ante las crisis convulsivas que actúan en conjunto de manera sinérgica con los sistemas de neurotransmisión evaluados en esta tesis. Esta aproximación puede ser explorada en estudios posteriores para confirmar los hallazgos y tener un mejor entendimiento de los mecanismos que subyacen la actividad anticonvulsiva de *Salvia circinnata* y de *amarisolida* A.

## 10. Referencias

- *Abscesos*. (2021). Medlineplus.gov; National Library of Medicine. <https://medlineplus.gov/spanish/abscess.html#:~:text=Un%20absceso%20es%20una%20cavidad,tejido%20lesionado%20y%20causan%20inflamaci%C3%B3n>.
- Akbar, A. H., Tariq, M., & Nisa, M. (1985). Pharmacological studies on *Salvia haematodes* Wall. *Acta Tropica*, 42(4), 371-374.
- Akbar, S., Tariq, M., & Nisa, M. (1984). A Study on CNS Depressant Activity of *Salvia haematodes* Wall. *International Journal of Crude Drug Research*, 22(1), 41-44. <https://doi.org/10.3109/13880208409070648>
- Alva-Díaz, C., Navarro-Flores, A., Rivera-Torrejón, O., Huerta-Rosario, A., Molina, R. A., Velásquez-Rimachi, V., Morán-Mariños, C., Farroñay, C., Pacheco-Mendoza, J., Metcalf, T., Burneo, J. G., & Pacheco-Barrios, K. (2021). Prevalence and incidence of epilepsy in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Epilepsia*, 62(4), 984–996. <https://doi.org/10.1111/epi.16850>
- Amilhon, B., Carey, Y. L., Manseau, F., Ducharme, G., Nichol, H., Adamantidis, A., & Williams, S. (2015). Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron*, 86(5), 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.027>
- Anney, R., Andreja Avbersek, Balding, D. J., Baum, L., Becker, F., Berkovic, S. F., Bradfield, J. P., Brody, L. C., Buono, R. J., Catarino, C. B., Cavalleri, G. L., Cherny, S. S., Chinthapalli, K., Coffey, A. J., Compston, A., Cossette, P., G de Haan, Peter De Jonghe, de, G. F., & Delanty, N. (2014). Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology*, 13(9), 893–903. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70171-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70171-1)
- Başar, E., Basar-Eroglu, C., Karakaş S., & Schürmann, M. (2001). Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes. *International Journal of Psychophysiology*, 39(2-3), 241–248. [https://doi.org/10.1016/s0167-8760\(00\)00145-8](https://doi.org/10.1016/s0167-8760(00)00145-8)
- Becker, A. C. (2018). Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(1), 112–129. <https://doi.org/10.1111/nan.12451>
- Berg, A. T., & Shinnar, S. (1991). The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: A quantitative review. *Neurology*, 41(7), 965–965. <https://doi.org/10.1212/wnl.41.7.965>
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., J. Helen Cross, Emde, van, Engel, J., French, J. A., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R.,

- Perrine Plouin, & Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x>
- Berg, A. T., Levy, S. E., Testa, F. M., & Blumenfeld, H. (2014). Long-term seizure remission in childhood absence epilepsy: Might initial treatment matter? *Epilepsia*, 55(4), 551–557. <https://doi.org/10.1111/epi.12551>
  - Binnie, C. D., & Stefan, H. (1999). Modern electroencephalography: its role in epilepsy management. *Clinical Neurophysiology*, 110(10), 1671–1697. [https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(99\)00125-x](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(99)00125-x)
  - Bomben, V. C., Isamu Aiba, Qian, J., Mark, M. D., Herlitze, S., & Noebels, J. L. (2016). Isolated P/Q Calcium Channel Deletion in Layer VI Corticothalamic Neurons Generates Absence Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 36(2), 405–418. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2555-15.2016>
  - Brodie, M. J. (2017). Outcomes in newly diagnosed epilepsy in adolescents and adults: Insights across a generation in Scotland. *Seizure*, 44, 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.08.010>
  - Brodie, M. J., Zuberi, S. M., Scheffer, I. E., & Fisher, R. S. (2018). The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know? *Epilepsy Disorders*, 20(2), 77–87. <https://doi.org/10.1684/epd.2018.0957>
  - Capote, G., Cerisola, A., & Scavone, C. (2009). Espasmos epilépticos de inicio tardío: presentación de un caso clínico. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 80(2), 118–122. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-12492009000200007#:~:text=Los%20espasmos%20epil%C3%A9pticos%20\(EE\)%20son,asim%C3%A9tricos%2C%20o%20con%20formas%20m%C3%A1s](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492009000200007#:~:text=Los%20espasmos%20epil%C3%A9pticos%20(EE)%20son,asim%C3%A9tricos%2C%20o%20con%20formas%20m%C3%A1s)
  - Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
  - Claes, L., Jurgen Del-Favero, Bertien Ceulemans, Lieven Lagae, Christine Van Broeckhoven, & Peter De Jonghe. (2001). De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1327–1332. <https://doi.org/10.1086/320609>
  - Coulter, D. A., Huguenard, J. R., & Prince, D. A. (1989). Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Annals of Neurology*, 25(6), 582–593. <https://doi.org/10.1002/ana.410250610>
  - Deidda, G., Crunelli, V., & Di Giovanni, G. (2021). 5-HT/GABA interaction in epilepsy. *Progress in Brain Research*, 265–286. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2021.01.008>
  - *Diagnosing epilepsy* | *Epilepsy Society*. (2020, March 15). Epilepsysociety.org.uk. <https://epilepsysociety.org.uk/about-epilepsy/diagnosing-epilepsy>
  - Ebersole, J. S., & Pedley, T. J. (2003). Current practice of clinical electroencephalography, 3<sup>rd</sup> edn. *European Journal of Neurology*, 10(5), 604–605. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2003.00643.x>
  - *Epilepsy: Electrocorticography (ECoG)* (2023). American Association of Neurological Surgeons. <https://www.aans.org/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Epilepsy%20Electrocorticography>
  - Espinosa-Jovel, C., Toledano, R., Aledo-Serrano, A., García-Morales, I., & Gil-Nagel, A. (2018). Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. *Seizure-*

- Ferry, B., Gervasoni, D., & Vogt, C. (2014). Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent. *Handbook on Best Practices*, 1-181. <https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0472-9>
- Feyissa, A. M., & Tatum, W. O. (2019). Adult EEG. *Handbook of Clinical Neurology*, 103–124. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64032-1.00007-2>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Boas, W. van E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017a). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., D’Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E. M., & Zuberi, S. M. (2017b). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), 531–542. <https://doi.org/10.1111/epi.13671>
- French, J. A., & Faught, E. (2009). Rational polytherapy. *Epilepsia*, 50, 63–68. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02238.x>
- Fundación UNAM. (2019, 24 agosto). *Se calcula que en México hay dos millones de personas con epilepsia*. Fundación UNAM. <https://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/se-calcula-que-en-mexico-hay-dos-millones-de-personas-con-epilepsia/>
- Glauser, T. A., Avital Cnaan, Shlomo Shinnar, Hirtz, D., Dlugos, D. J., Masur, D., Clark, P., Capparelli, E. V., & Adamson, P. C. (2010). Ethosuximide, Valproic Acid, and Lamotrigine in Childhood Absence Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 362(9), 790–799. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0902014>
- Glauser, T. A., Ben-Menachem, E., Blaise, Avital Cnaan, Carlos, Reetta Kälviäinen, Mattson, R. H., French, J. A., Perucca, E., & Tomson, T. (2013). Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, 54(3), 551–563. <https://doi.org/10.1111/epi.12074>
- González-Gallegos, J. G., Bedolla-García, B. Y., Cornejo-Tenorio, G., Fernández-Alonso, J. L., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., Harley, R. M., Klitgaard, B., Martínez-Gordillo, M. J., Wood, J. R. I., Zamudio, S., Zona, S., & Xifreda, C. C. (2020). Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphace* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 831–856. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/suppl/10.1086/709133>
- González-Trujano, M. E., Kregel, F., Reyes-Chilpa, R., Villasana-Salazar, B., Gonzalez-Gomez, J. C., Santos-Valencia, F., Urbina-Trejo, E., Martínez, A., &

- Martínez-Vargas, D. (2022). *Tabernaemontana arborea* and ibogaine induce paroxysmal EEG activity in freely moving mice: Involvement of serotonin 5-HT1A receptors. *NeuroToxicology*, 89, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.01.002>
- González-Trujano, M. E., Martínez-González, C. L., Flores-Carrillo, M., Luna-Nophal, S. I., Contreras-Murillo, G., & Magdaleno-Madrigal, V. M. (2018). Behavioral and electroencephalographic evaluation of the anticonvulsive activity of *Moringa oleifera* leaf non-polar extracts and one metabolite in PTZ-induced seizures. *Phytomedicine*, 39, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.009>
  - Gorter, J. A., van Vilet, E. A., & Lopes da Silva, F. H. (2016). Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *Journal of Neuroscience Methods*, 260, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.025>
  - Guerrini, R., Dravet, C., Genton, P., Belmonte, A., Kaminska, A., & Dulac, O. (1998). Lamotrigine and Seizure Aggravation in Severe Myoclonic Epilepsy. *Epilepsia*, 39(5), 508–512. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01413.x>
  - Hanaya, R., & Arita, K. (2016). The New Antiepileptic Drugs: Their Neuropharmacology and Clinical Indications. *Neurologia medico-chirurgica*, 56(5), 205–220. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2015-0344>
  - Hauser, W. A., Rich, S. S., Lee, J. R.-J., Annegers, J. F., & Anderson, V. E. (1998). Risk of Recurrent Seizures after Two Unprovoked Seizures. *The New England Journal of Medicine*, 338(7), 429–434. <https://doi.org/10.1056/nejm199802123380704>
  - Hernandez-Leon, A., Moreno-Pérez, F. G., Martínez-Gordillo, M., Aguirre-Hernández, E., Valle-Dorado, G., M., Díaz-Reval, I., González-Trujano, M. E., & Pellicer, F. (2021). Lamiaceae in Mexican Species, a Great but Scarcely Explored Source of Secondary Metabolites with Potential Pharmacological Effects in Pain Relief. *Molecules*, 26(24), 7632. <https://doi.org/10.3390/molecules26247632>
  - Höller, Y., Helmstaedter, C., & Lehnertz, K. (2018). Quantitative Pharmacoelectroencephalography in Antiepileptic Drug Research. *CNS Drugs*, 32(9), 839–848. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0557-x>
  - Horn, C. C., Ater, S. B., & Hurst, D. J. (1986). Carbamazepine-exacerbated epilepsy in children and adolescents. *Pediatric Neurology*, 2(6), 340–345. [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(86\)90074-3](https://doi.org/10.1016/0887-8994(86)90074-3)
  - Imanshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2006). The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytotherapy Research*, 20(6), 427–437. <https://doi.org/10.1002/PTR.1898>
  - Iwasaki, S., Sasaki, T., & Ikegaya, Y. (2021). Hippocampal beta oscillations predict mouse object-location associative memory performance. *Hippocampus*, 31(5), 503–511. <https://doi.org/10.1002/hipo.23311>
  - Jamali, H., & Heydari, A. (2020). Effect of dextromethorphan/quinidine on pentylenetetrazole- induced clonic and tonic seizure thresholds in mice. *Neuroscience Letters*, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134988>
  - Jasper, H., & Kershman, J. (1941). Electroencephalographic Classification of the Epilepsies. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 45(6), 903–903. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1941.02280180015001>
  - Kane, N., Acharya, J. N., Sandor Beniczky, Sales, O., Finnigan, S., Kaplan, P. W., Hiroshi Shibasaki, Pressler, R. M., & J.A.M, M. (2017). A revised glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers and updated proposal for the report format of the EEG findings. Revision 2017. *Clinical Neurophysiology Practice*, 2, 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.cnp.2017.07.002>



- Koutroumanidis, M., Arzimanoglou, A., Caraballo, R., Goyal, S., Kaminska, A., Laoprasert, P., Oguni, H., Rubboli, G., Tatum, W., Thomas, P., Trinka, E., Vignatelli, L., & Moshé, S. L. (2017). The role of EEG in the diagnosis and classification of the epilepsy syndromes: a tool for clinical practice by the ILAE Neurophysiology Task Force (Part 1). *Epileptic Disorders*, 19(3), 233–298. <https://doi.org/10.1684/epd.2017.0935>
- Kwan, P., & Brodie, M. J. (2000). Early Identification of Refractory Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 342(5), 314–319. <https://doi.org/10.1056/nejm200002033420503>
- Landmark C.J., & Patsalos, P. N. (2010). Drug interactions involving the new second- and third-generation antiepileptic drugs. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10(1), 119–140. <https://doi.org/10.1586/ern.09.136>
- Li, D., Yuan, H., Ortiz-Gonzalez, X. R., Marsh, E. D., Tian, L., McCormick, E. M., Kosobucki, G. J., Chen, W., Schulien, A. J., Chiavacci, R. M., Anel Tankovic, Naase, C., Brueckner, F., Celina von Stülpnagel-Steinbeis, Hu, C., Kusumoto, H., Ulrike, Elsen, G. E., Konstanze Hörtnagel, & Aizenman, E. (2016). GRIN2D Recurrent De Novo Dominant Mutation Causes a Severe Epileptic Encephalopathy Treatable with NMDA Receptor Channel Blockers. *American Journal of Human Genetics*, 99(4), 802–816. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.07.013>
- Liu, W., Ge, T., Pan, Z., Leng, Y., Jiayin Lv, & Li, B. (2017). The effects of herbal medicine on epilepsy. *Oncotarget*, 8(29), 48385–48397. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16801>
- Löscher, W., & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, 52(4), 657–678. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x>
- Lu, X.-C. M., Browning, J. R., Liao, Z., Cao, Y., Yang, W., & Shear, D. A. (2020). Post-Traumatic Epilepsy and Seizure Susceptibility in Rat Models of Penetrating and Closed-Head Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 37(2), 236–247. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6573>
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijtelaaar, G. (2009). A revised Racine’s scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*, 98(5), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>
- Maheshwari, A., Marks, R. L., Yu, K., & Noebels, J. L. (2015). Shift in interictal relative gamma power as a novel biomarker for drug response in two mouse models of absence epilepsy. *Epilepsia*, 57(1), 79–88. <https://doi.org/10.1111/epi.13265>
- Manford, M. (2017). Recent advances in epilepsy. *Journal of Neurology*, 264(8), 1811–1824. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8394-2>
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejotenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., González-Gallegos, J. G., Lara-Cabrera, S. I., & Zamudio, S. (2017). Lamiaceae of Mexico. *Botanical Sciences*, 95(4), 780–806. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1871>
- Mikati, M. A., Jiang, Y., Carboni, M. P., Vandana Shashi, Petrovski, S., Spillmann, R. C., Milligan, C. J., Melody, Greffe, A., McConkie, A., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E., Mullen, S. A., Bonner, M. J., Petrou, S., & Goldstein, D. (2015). Quinidine in the treatment of KCNT1-positive epilepsies. *Annals of Neurology*, 78(6), 995–999. <https://doi.org/10.1002/ana.24520>
- Millichap, J., Park, K., Tsuchida, T. N., Bruria Ben-Zeev, Carmant, L., Flamini, R., Joshi, N., Levisohn, P. M., Marsh, E. D., Nangia, S., Narayanan, V., Ortiz-Gonzalez, X. R., Patterson, M. C., Pearl, P. L., Porter, B. E., Ramsey, K., Mcginnis, E.,

- Taglialatela, M., Tracy, M., & Tran, B. (2016). KCNQ2encephalopathy. *Neurology Genetics*, 2(5), e96–e96. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000096>
- Milligan, C. J., Melody, Gazina, E. V., Heron, S. E., Nair, U., Trager, C., Reid, C. M., Venkat, A., Younkin, D. P., Dlugos, D. J., Petrovski, S., Goldstein, D., Dibbens, L. M., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., & Petrou, S. (2014). KCNT1gain of function in 2 epilepsy phenotypes is reversed by quinidine. *Annals of Neurology*, 75(4), 581–590. <https://doi.org/10.1002/ana.24128>
  - Moreno-Pérez, G. F., González-Trujano, M. E., Hernandez-Leon, A., Valle-Dorado, M. G., Valdés-Cruz, A., Alvarado-Vásquez, N., Aguirre-Hernández, E., Salgado-Ceballos, H., & Pellicer, F. (2022). Antihyperalgesic and Antiallodynic Effects of Amarisolide A and *Salvia amarissima* Ortega in Experimental Fibromyalgia-Type Pain. *Metabolites*, 13(1), 59–59. <https://doi.org/10.3390/metabo13010059>
  - Moreno-Pérez, G. F., González-Trujano, M. E., Martínez-Gordillo, M. J., Miguel-Chávez, R. S., Basurto-Peña, F. A., Dorazco-González, A., & Aguirre-Hernández, E. (2019). Amarisolide A and pedalin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinnata*. *Botanical Sciences*, 97(3), 355–365. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.2187>
  - Moreno-Pérez, G. F., Hernandez-Leon, A., Valle-Dorado, M. G., Cano-Martínez, A., Narváez-González, F., Aguirre-Hernández, E., Salgado-Ceballos, H. & González-Trujano, M. E. (2021). Neo-clerodane diterpenic influence in the antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Salvia circinnata* Cav. *Journal of Ethnopharmacology*, 268. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113550>
  - Naderi, N., Akhavan, N., Aziz Ahari, F., Zamani, N., Kamalinejad, M., Shokrzadeh, M., Ahangar, N., & Motamedi, F. (2011). Effects of Hydroalcoholic Extract from *Salvia verticillata* on Pharmacological Models of Seizure, Anxiety and Depression in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 10(3), 535–545. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813044/>
  - Noachtar, S., & Rémi, J. (2009). The role of EEG in epilepsy: A critical review. *Epilepsy & Behavior*, 15(1), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.035>
  - Noriega-Morales, G., & Shkurovich-Bialik, P. (2020). The situation of epilepsy in Mexico and Latin America. *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC*, 65, 224–232. <https://doi.org/10.35366/95680>
  - Oliva, M., Berkovic, S. F., & Petrou, S. (2012). Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. *Epilepsia*, 53(11), 1849–1859. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03631.x>
  - Orer, H. S., Clement, M. E., Barman, S. M., Zhong, S., Gebber, G. L., & McCall, R. B. (1996). Role of serotonergic neurons in the maintenance of the 10-Hz rhythm in sympathetic nerve discharge. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 270(1), R174–R181. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.270.1.r174>
  - Ortiz-Mendoza, N., Zavala-Ocampo, L. M., Martínez-Gordillo, M. J., González-Trujano, M. E., Peña, F. A. B., Bazany-Rodríguez, I. J., Chávez, J. A. R., Dorazco-González, A., & Aguirre-Hernández, E. (2020). Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a neo-clerodane diterpene from *Salvia semiatrata* aerial parts. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 620–629. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1784235>
  - Pérez-Ortega, G., & González-Trujano, M. E. (2015). Plantas medicinales contra la ansiedad. *Ciencia*, 66(3), 68–75. [Ansiedad.pdf \(amc.edu.mx\)](https://www.amc.edu.mx/ansiedad.pdf)

- Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Brindis, F., Vibrans, H., & Reyes-Chilpa, R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 221–228. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.01.040>
- Pillai, J., & Sperling, M. R. (2006). Interictal EEG and the Diagnosis of Epilepsy. *Epilepsia*, 47(s1), 14–22. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00654.x>
- Preux, P.M., & Druet-Cabanac, M. (2005). Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan Africa. *The Lancet Neurology*, 4(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(04\)00963-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(04)00963-9)
- Rowan, A.J., Veldhuisen, R. J., & Nagelkerke, N. (1982). Comparative evaluation of sleep deprivation and sedated sleep EEGs as diagnostic aids in epilepsy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 54(4), 357–364. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(82\)90199-7](https://doi.org/10.1016/0013-4694(82)90199-7)
- Saletu B., Grünberger J., Linzmayer L. (1986S). Evaluation of encephalotropic and psychotropic properties of gabapentin in man by pharmaco-EEG and psychometry. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, 24(7). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3525428/>
- Sannita, W. G., Balestra, V., DiBon, G., Hassan, K., & Rosadini, G. (1993). Ammonia-independent modifications of the background EEG signal and paradoxical enhancement of epileptic abnormalities in EEG after acute administration of valproate to epileptic patients. *Neuropharmacology*, 32(9), 919–928. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(93\)90148-v](https://doi.org/10.1016/0028-3908(93)90148-v)
- Schachter, S. C. (2009). Botanicals and herbs: A traditional approach to treating epilepsy. *Neurotherapeutics*, 6(2), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.12.004>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Schmidt D. (1982). The influence of antiepileptic drugs on the electroencephalogram: a review of controlled clinical studies. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. Supplement*, 36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6130939/>
- Shimada, T., & Yamagata, K. (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *Neuroscience*, 136. <https://doi.org/10.3791/56573>
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698–702. <https://doi.org/10.1038/nature07991>
- Solares-Pascasio, J. I., Ceballos, G., Calzada, F., Barbosa, E., & Velazquez, C. (2021). Antihyperglycemic and Lipid Profile Effects of *Salvia amarissima* Ortega on Streptozocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26040947>
- Squires, R. F., Saederup, E., Crawley, J. N., Skolnick, P., & Paul, S. M. (1984). Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sciences*, 35(14), 1439–1444. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90159-0)
- Stephen, L., & Brodie, M. J. (2011). Pharmacotherapy of Epilepsy. *Pharmacotherapy of Epilepsy*, 25(2), 89–107. <https://doi.org/10.2165/11584860-000000000-00000>



- Sucher, N. J., & Carles, M. C. (2015). A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 52, 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.012>
- Shkolnik, T. G., Feuerman, H., Didkovsky, E., Kaplan, I., Bergman, R., Pavlovsky, L., & Hodak, E. (2014). Blue-Gray Mucocutaneous Discoloration. *Journal of the American Medical Association Dermatology*, 150(9), 984–984. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.8895>
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
- Tlacomulco-Flores, L. L., Déciga-Campos, M., González-Trujano, M. E., Carballo-Villalobos, A. I., & Pellicer, F. (2020). Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvinorins in experimental pain models in mice. 248, 276. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.112276>
- Tortoriello J., & Romero O. (1992). Plants used by Mexican traditional medicine with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1308799/>
- Tripathi, M., Garg, A., Gaikwad, S., Bal, C. S., Chitra, S., Prasad, K., Dash, H. H., Sharma, B. S., & Chandra, P. Sarat. (2010). Intra-operative electrocorticography in lesional epilepsy. *Epilepsy Research*, 89(1), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.12.007>
- Valdés-Galván, R.E, González-Calderón G., & Castro-Martínez E. (2019). Epidemiología del descontrol de la epilepsia en un servicio de urgencias neurológicas. *Revista de Neurología*, 68(08), 321-325. <https://doi.org/10.33588/rn.6808.2018218>
- van Lier, H., Drinkenburg, W. H.I.M., Y.J.W, van Eeten, & Coenen, A. M. L. (2004). Effects of diazepam and zolpidem on EEG beta frequencies are behavior-specific in rats. *Neuropharmacology*, 47(2), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.03.017>
- Wang, Y., Wei, P.-H., Yan, F., Luo, Y., & Zhao, G. (2022). Animal Models of Epilepsy: A Phenotype-oriented Review. *Aging and Disease*, 13(1), 215–215. <https://doi.org/10.14336/ad.2021.0723>
- Wickenden, A. D., Yu, W., Zou, A., Jegla, T., & P. Kay Wagoner. (2000). Retigabine, A Novel Anti-Convulsant, Enhances Activation of KCNQ2/Q3 Potassium Channels. *Molecular Pharmacology*, 58(3), 591–600. <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.591>
- World Health Organization. (2023, February 9). *Epilepsy*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Wu, X., & Xiao, C. H. (1997). Quantitative Pharmaco-EEG of Sustained Release Valproate in Epileptics. *Clinical Electroencephalography*. 28(2) <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/155005949702800210>