

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

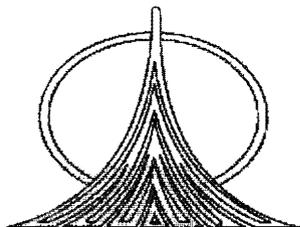
---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del efecto sedante de la  
7-O-glucosilacetina en modelos animales de  
conducta y su posible interacción con el sistema  
GABAérgico.**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G A**  
P R E S E N T A :  
**ANA GABRIELA ARAUJO ESCALONA**

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. ROSA ESTRADA REYES  
ASESORA: DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO



MÉXICO, D.F.

2009



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional de la alumna

ARAUJO ESCALONA ANA GABRIELA

Quien presenta como trabajo recepcional: Evaluación del efecto sedante de la 7-O-glucosilacetina en modelos de conducta animal y su posible interacción con el sistema GABAérgico.

- PRESIDENTE O. F. I. MA. DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA OYARZABAL
- VOCAL M. en C. ROSA ESTRADA REYES
- SECRETARIO DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO
- SUPLENTE M. en BSH ANDÉLICA FLORES RAMÍREZ
- SUPLENTE O. MARTHA TRINIDAD JULIETA OLIVEROS GARCIA

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarles.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 12 de mayo de 2009.

M. en C. CARLOS PÉREZ MALVÁEZ  
JEFE DE LA CARRERA



c.e.p. Departamento de Control de Escalar

*A mi familia:*

*Mario, Rosa y Vicky:*

*... he escrito tantas líneas y no sé como describir todo lo que tenemos y como han marcado mi vida, pero qué puedo decir ante los que me han formado y los que han construido los cimientos de mi mente y mi corazón. Lo único que puedo escribir es que Los AMO y siempre estaré allí para ustedes.*

*Cristy:*

*La hermana que he decidido tener... Gracias amiga por aceptarme en tu vida.*

*A mis maestros:*

*Dra. Rosa Estrada Reyes:*

*... que le puedo escribir, ustedes es ese tipo de persona que es difícil de encontrar y que cuando aparecen uno no desea que salga de ella. Gracias por las sugerencias, las pláticas y el apoyo que siempre me ha brindado, sobre todo por permitirme ser su alumna y su amiga.*

*Dra. Hortensia Rpsas Acevedo:*

*Gracias por su orientación y consejos, por compartir su experiencia conmigo, Ara, Josephin, Angie y Govis y hacer divertido el regreso a casa en los días del Instituto.*

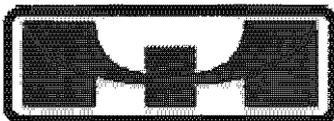
*Dr. Eduardo Calixto:*

*Muchas gracias por la paciencia, por el conocimiento y por permitir integrarme al Laboratorio de Neurobiología. No sabe cuántas experiencias he aprendido con usted y mis compañeros.*

*A mis compañeros de Fitofarmacología y Neurobiología:*

*... esas divertidas charlas siempre hicieron muy ameno el trabajo de labo, muchas gracias por brindarme su amistad Isma y Lore.*

*... no solo por su amistad y los buenos momentos en el laboratorio, sino por compartir conmigo sus conocimientos con tanta paciencia, gracias por ayudarme en la parte electrofisiológica de esta tesis: Gerardo y Uri*



El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Fitofarmacología,  
de la División de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría  
Ramón de la Fuente Muñiz.

El estudio Electrofisiológico se realizó en el Laboratorio de Neurobiología, de la División  
de Investigaciones Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente  
Muñiz, bajo la asesoría del Dr. Eduardo Calixto.

Esta tesis forma parte del proyecto 3620, el cual contó con la aprobación de los Comités de  
Ética y de Investigación Científica del INPRM.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>II. MARCOTEÓRICO</b> .....	11
➤ Fitoquímica de la familia <i>Lamiaceae</i> .....	11
➤ Antecedentes del género <i>Agastache</i> .....	12
➤ Generalidades sobre los flavonoides.....	15
➤ Ansiedad.....	19
➤ Sistema inhibitorio GABAérgico.....	21
➤ Receptores GABAérgicos.....	24
➤ Fisiología y recaptura del GABA.....	27
➤ Modulación del receptor GABA <sub>A</sub> .....	29
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>VI. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	35
➤ Fármacos y Sustancias.....	35
➤ Animales.....	36
1. Aislamiento y Caracterización de 7- <i>O</i> -GAC.....	36
2. Prueba de prolongación del tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.....	38
3. Evaluación de los efectos sedantes y/o-ansiolíticos en el modelo del tablero con perforaciones.....	39
4. Evaluación de los efectos anti-convulsivos de 7- <i>O</i> -GAC en el modelo de convulsiones inducidas químicamente.....	40
5. Determinación de la actividad sináptica en el área CA1 del hipocampo, inducida por 7- <i>O</i> -GAC.....	43
➤ Análisis estadístico.....	46
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	47
Aislamiento y caracterización de 7- <i>O</i> -GAC.....	47
Evaluación farmacológica.....	48

VII.	Estudio de los cambios electrofisiológicos inducidos por 7-O-GAC en el área CA1 del hipocampo de rata	52
VIII.	CONCLUSIONES.....	61
IX	Anexo I.....	62
X.	REFERENCIAS.....	66

## ABREVIATURAS

7-O-GAC	7-O-glucosilacetina
ACT-L	actividad locomotriz
BDZ	benzodicepinas
Bic	bicuculina
CA1	área CA1 del hipocampo.
Ca <sup>2+</sup>	ión calcio
Cl <sup>-</sup>	cloruro
DMSO	dimetil sulfoxido
E/R	estímulo/respuesta
fEPSP	Potencial de campo post-sináptico excitatorio
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	receptor ionotrópico de GABA (receptor tipo A)
GABA <sub>B</sub>	receptor metabotrópico de GABA (receptor tipo B)
GABA-T	enzima GABA-transaminasa
GAD	enzima glutamato descarboxilasa
TP	tablero con perforaciones
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
ip	intraperitoneal
ms	milisegundos
NA	número de asomadas
NP	número de paradas
TA	tiempo de asomadas
PB	pentobarbital sódico
CLAR-EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Espectrómetro de Masas
gl	grados de libertad
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
M <sup>+</sup>	Ión molecular
ss	solución salina
PTZ	pentilentetrazol
SNC	Sistema Nervioso Central
subesp	subespecie

## RESUMEN

Los flavonoides son metabolitos secundarios de bajo peso molecular presentes en plantas vasculares, el hombre las consume cotidianamente en la dieta, ya que están presentes de forma abundante en los vegetales, las frutas rojas como las moras, fresas, son también prominentes en frutas cítricas, el chocolate, y el vino tinto, entre otros alimentos.

Recientemente, los flavonoides han generado interés como nuevas entidades químicas con actividad en el SNC, de manera que se han descrito una variedad de flavonoides, con efectos ansiolíticos, sedantes, neuroprotectores y antiepilépticos; todos ellos aislados de plantas con reconocidos efectos sobre el SNC, como por ejemplo: la hierba de San Juan (*Hipericum perforatum*) y la pasiflora (*Passiflora caerulea*). Aun más, se ha propuesto que los flavonoides ejercen sus efectos centrales a través de diferentes interacciones con el sistema GABAérgico.

La 7-*O*-glucosilacetina es uno de los principales metabolitos secundarios de tipo flavonoide presente en *Agastache mexicana* subesp. *mexicana*, conocida popularmente como toronjil morado, la cual es empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de "los nervios", como inductor del sueño y como tranquilizante suave.

El propósito de este trabajo fue, evaluar el efecto sedante de la 7-*O*-glucosilacetina en el modelo animal del tablero con perforaciones, así como determinar su posible interacción con el sistema GABAérgico en el área CA1 del hipocampo de rata, evaluado en rebanadas sagitales de cerebro por medio de registros sinápticos.

Los resultados indican que la 7-*O*-glucosilacetina induce un efecto sedante en ratones a través de su interacción directa con el sistema GABAérgico, el cual es el principal sistema inhibitorio del SNC en los mamíferos, incluido el hombre.

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas en rituales de sanación o como remedios medicinales ha acompañado a las civilizaciones del mundo a través del tiempo, asentando a un sin número de especies, como valiosas herramientas de “sanación” de diversos padecimientos. Recientemente, la búsqueda de la “cura” o alivio de enfermedades a través del conocimiento de las propiedades curativas de las plantas, es el punto de lanza de las investigaciones y desarrollo de nuevas moléculas con potencial farmacológico.

En México, como en otras civilizaciones, el consumo de plantas como fuente de alimentación o como un recurso medicinal se remonta a tiempos anteriores a la conquista; un ejemplo de ello son textos como el Códice de la Cruz y Badiano escrito en 1552. Hoy en día, un gran porcentaje de la población sigue recurriendo a esta práctica médica para el tratamiento de diversas enfermedades (Kurt y Andrew, 2002). Partiendo de lo anterior, distintos centros de investigación del país han retomado estos conocimientos ancestrales enfocados, principalmente a la caracterización química de metabolitos secundarios como marcadores taxonómicos de las especies vegetales. Sin embargo, es reciente el interés por conocer el potencial de estas moléculas como fármacos y como herramientas útiles en la terapéutica moderna.

Por otro lado, en la actualidad y debido al acelerado ritmo de vida que impera en las sociedades modernas, son cada vez más frecuentes los padecimientos relacionados con el Sistema Nervioso Central, como lo son las alteraciones del sueño, los trastornos de ansiedad y depresión. Siendo reciente su inclusión en la lista de problemas de salud pública.

Las prescripciones médicas para estos trastornos consisten principalmente en fármacos ansiolíticos y/o sedantes pertenecientes al grupo de las benzodiazepinas. Sin

embargo, un amplio sector de la población recurre al uso de las plantas como alternativa para aliviar estos trastornos (Pérez de la Mora, 2003).

A este respecto, México es un país con una amplia distribución y comercialización de plantas medicinales, lo cual le permite tener una gran tradición en el uso de remedios herbolarios exclusivos para el tratamiento de trastornos relacionados con el SNC, tales como: *Hipericum perforatum* (hierba de San Juan), *Agastache mexicana* subesp *mexicana* (toronjil morado), *Agastache mexicana* subesp *xolocotziana* (toronjil blanco), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Ternstroemia sylvatica* (tila), *Tilia americana* (azar), *Dracocephalum moldavica* (toronjil azul), entre otras (Wong y cols., 1998).

A pesar del amplio uso de este tipo de plantas en nuestro país, la información sobre sus constituyentes químicos y la evaluación farmacológica de los efectos que se les atribuye es escasa. Recientemente, se ha descrito en la literatura una gran variedad de metabolitos secundarios de tipo flavonoide aislados de plantas con reconocidos efectos sobre el SNC, las cuales son utilizadas en la medicina tradicional (Wang y cols., 2005; Marder y cols., 2003), de manera que, se ha propuesto a los flavonoides como los responsables de los efectos sobre el SNC producidos por dichas plantas.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación farmacológica de la 7-O-glucosilacetina aislada del *Agastache mexicana* subsp *mexicana* (toronjil morado) en modelos animales de conducta y determinar su posible interacción con el sistema GABAérgico, en el modelo electrofisiológico de potencial de campo post-sináptico excitatorio (fEPSP, por sus siglas en inglés).

## II. MARCO TEÓRICO

### ➤ Fitoquímica de la familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae; conocida también como la familia de la menta, está representada por más de 6000 especies agrupadas en 220 géneros, con una distribución cosmopolita, ya que se encuentra presente en zonas húmedas y/o templadas; por lo que se les puede encontrar en todo el mundo (Kotsos, 2007). Debido a su amplia disposición como recurso natural y la vasta diversidad que presenta, esta familia pertenece al grupo de plantas empleadas en las prácticas médicas populares, algunas de ellas destacan como remedios herbolarios para el control del sueño, el mal de los “nervios” o el “espanto” (Linares y cols., 1997).

No obstante, los avances en el área de síntesis y desarrollo de nuevos fármacos, el conocimiento, tradición y uso de las plantas curativas, es un punto de partida fiable para la búsqueda y desarrollo de principios activos. Estudios realizados a especies pertenecientes a la familia Lamiaceae tales como la *Rabdosia* sp, la *Coleus forskohlii*, y la *Salvia miltiorrhiza* han creado expectativas en cuanto a nuevas moléculas con potencial farmacológico, entre las que destacan: terpenoides, aceites fijos y volátiles, alcaloides, taninos, saponinas y flavonoides. En cuanto a los flavonoides, en ésta familia se han descrito más 147 estructuras diferentes, siendo las flavonas las de mayor abundancia (60%), seguidas por los flavonoles (16%) y las flavanonas (20%), mientras que, los dihidroflavonoles y las chalconas son los menos frecuentes (2%) (Li y Ding, 2001).

Además del conocimiento que representa su caracterización química, es amplio el horizonte que se abre ante la posibilidad de generar nuevas moléculas con potencial

farmacológico para el tratamiento de padecimientos y trastornos que en la actualidad son problemas de salud mundial.

En este sentido, el valor medicinal que se ha atribuido a algunas especies de esta familia es frecuentemente relacionado a la presencia de alguna de estas entidades químicas (Barberán, 1990; Díaz y Sarmiento, 1988; Rodríguez-Hahn y Cárdenas, 1999).

### ➤ Antecedentes del género *Agastache*



Figura 1. *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*

El género *Agastache* es uno de los 12 géneros de la familia Lamiaceae y está representado por 20 especies, distribuidas en Asia y Norte América. *Agastache mexicana* es una especie endémica de nuestro territorio (Sanders, 1987). Esta especie se divide a su vez, en dos subespecies: *A. mexicana* subsp. *mexicana* (Figura 1) y *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*; (Figura 2) conocidas

tradicionalmente como toronjil morado y toronjil blanco, respectivamente. Infusiones de toronjil morado solo o en combinación con el toronjil blanco son ampliamente utilizadas para el tratamiento de los “nervios” o para curar el “espanto”. Mientras que, la infusión compuesta por toronjil morado, toronjil blanco y toronjil extranjero (*Dracocephalum moldavica*); conocida como el complejo de “los tres toronjiles” tiene también un amplio uso en la medicina tradicional mexicana como inductor del sueño, tranquilizante nervioso, o para tratar el insomnio.



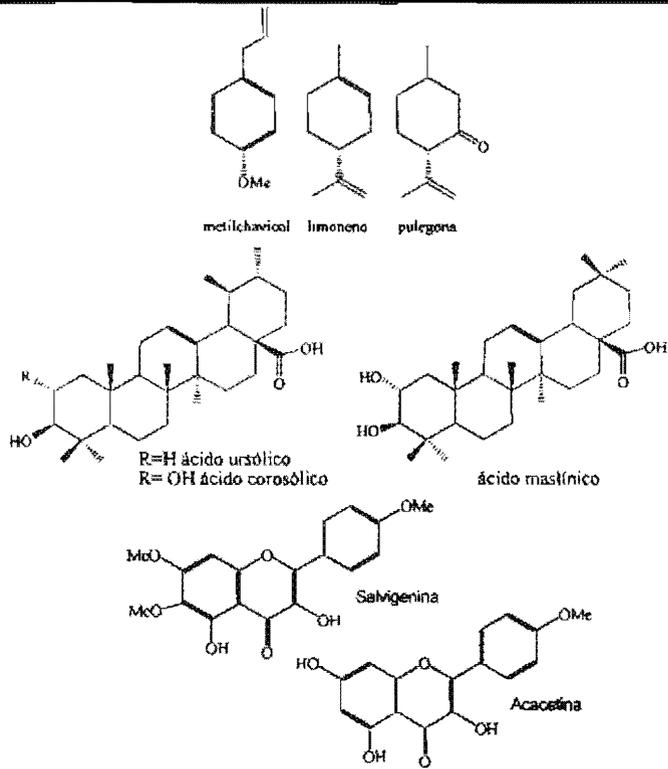
Figura 2. *Agastache mexicana*  
subesp. *xolocotziana*

El toronjil morado (*Agastache mexicana* subesp. *mexicana*) es uno de los ejemplos más claros de uso y remedio en la medicina tradicional como un recurso primario para la "cura" de padecimientos relacionados con el SNC debido a sus propiedades sedantes (Bye y Linares 1988; Linares y cols., 1995). A pesar del amplio uso del toronjil morado, es reciente la información formal sobre sus componentes químicos y sus posibles efectos farmacológicos.

El único informe sobre la composición química de *A. mexicana* subesp. *mexicana* (toronjil morado) y *A. mexicana* subesp. *xolocotziana* (toronjil blanco): es un estudio químico comparativo, el cual mostró diferencias notables en la composición de los metabolitos secundarios no polares de ambas especies, siendo el metil chavicol el sesquiterpeno más abundante de *A. mexicana* subesp. *mexicana*, mientras que; los sesquiterpenos limoneno y la pulegona fueron los productos principales de *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* (Figura 3), en cuanto a los metabolitos secundarios de polaridad media ambas especies mostraron una gran similitud; los ácidos ursólico, maslínico y eorosólico y

las flavonas 5-hidroxi, 7, 4'-dimetoxi flavona (acetina) y 5-hidroxi, 6, 7, 4', trimetoxi flavona (salvigenina) fueron comunes a ambas especies, siendo la única diferencia la presencia de la flavona 5, 7, 8-trihidroxi, 4', 6'-dimetoxi flavona (pilosina), presente en *A. mexicana* subesp. *xolocotziana*.

Mientras que, la comparación de los metabolitos secundarios de mayor polaridad (extractos metanólicos y acuosos) de ambas subespecies, mostró que *A. mexicana* subesp. *mexicana* y *A. mexicana* subesp. *xolocotziana* comparten los mismos glicósidos de flavonoide; siendo los productos más abundantes, la 7-O-glucosilacetina y 2-acetil-7-O-glucosilacetina. (Estrada y cols., 2004).



**Figura 3. Principales metabolitos secundarios de *A. mexicana* subesp *mexicana* y *A. mexicana* subesp *xolocotiana***

➤ Generalidades sobre los Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, en forma de glicósidos o agliconas. Actualmente, se han descrito aproximadamente 6000 estructuras diferentes en plantas vasculares; sin embargo, su proporción depende del tipo de planta, edad, ubicación geográfica y la disposición de nutrientes en el área de crecimiento (Barberán, 1990).

Los flavonoides son entidades químicas de bajo peso molecular, la base de su esqueleto está constituida por dos anillos aromáticos (A y B), unidos por una cadena de 3 átomos de carbono, que posteriormente darán origen al tercer anillo (C) como se muestra en la Figura 4. Los diferentes arreglos y grados de oxidación de esta estructura básica:  $C_6C_3C_6$  les confiere las características químicas y biológicas que las identifica, además de permitir su clasificación en: chalconas, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, y glucósidos de flavonoide, entre otras (Dewick, 1990).

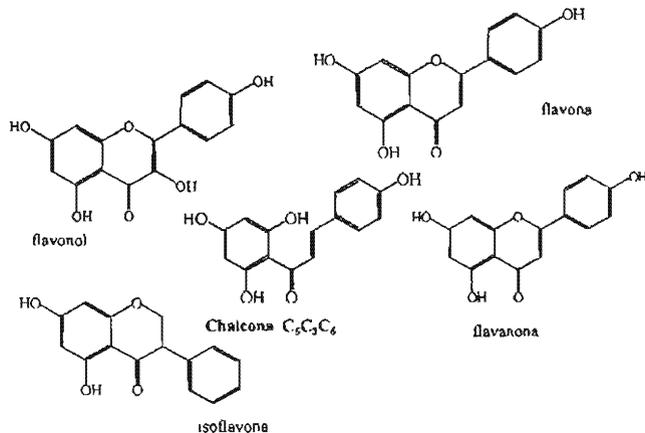


Figura 4. Clasificación de los flavonoides (Dewick, 1990).

El anillo A presenta grupos hidroxilo que convergen en las posiciones 5 y 7; mientras que para el anillo B estos grupos se encuentran posicionados en el carbono 4' o bien en el 3'. Además, los grupos hidroxilo en los anillos fenólicos pueden ser sustituidos por carbohidratos, de tal forma que muchos flavonoides se encuentran en la naturaleza como flavonoides glicosilados (Dewick, 1990).

La biosíntesis de los flavonoides, se lleva a cabo por medio de una ruta mixta que comprende tanto a la ruta del ácido shikímico como a la ruta del acetato-malonato. El intermediario común a todos los flavonoides es la chalcona (Figura 4) y su formación se lleva a cabo por una condensación tipo Claisen, entre la *p*-cumaril-CoA (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>) con tres unidades de malonil-CoA (C<sub>6</sub>) y a partir de éste, derivan los diferentes tipos de flavonoides (ver Figura 5. Ruta biogénica de los flavonoides).



La participación de estos metabolitos secundarios en los organismos vegetales es muy variada, ya sea formando parte de los mecanismos de defensa ante parásitos, hongos o invasiones microbianas (Fernández y cols., 2006). O bien, otorgan una pigmentación característica a flores y frutos de diversas especies, géneros y familias. Por citar algunos ejemplos: las chalconas otorgan una tonalidad amarilla, los flavonoles el color rojo, mientras que las antocianinas producen una variedad de colores en azul (Harbone, 1989).

La coloración producida por estas entidades químicas es vital para la reproducción vegetal, debido a que atrae insectos, aves y mamíferos (murciélagos) que asisten en el proceso de polinización o dispersión de la planta (Barberán, 1990; Harbone, 1989). Además, se ha descrito su participación en la protección de la foto-oxidación de la luz ultravioleta y la depredación (Fernández y cols., 2006).

Además de las funciones que desempeñan en los organismos vegetales, algunas investigaciones sugieren que estas moléculas presentan efectos sobre la función de múltiples sistemas celulares en mamíferos; de hecho se ha descrito que algunos flavonoides son antioxidantes, debido a su potencial quelante que los hace ser buenos atrapadores de radicales libres; así como por su capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos (Hollman y Katan, 1997; Ebadí, 2002).

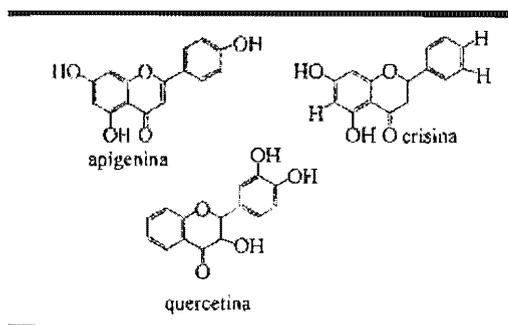


Figura 6. Flavonoides con actividad sobre el SNC

Por otro lado, estudios realizados con ratones han mostrado los efectos sobre el SNC de una variedad de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, por ejemplo los efectos ansiolíticos y antiepilépticos

de la apigenina y la crisina (Figura 6), los efectos depresores del flavanol; quercetina (Figura 6), también se han descrito los efectos centrales de algunos glucósidos de flavonoide, como por ejemplo: los efectos sedantes de la 2-S-hesperidina (rutinósido de flavanona) y de la linarina (rutinósido de flavona) (Figura 7) (Viola y cols., 1995; Wolfman y cols., 1998; Avallone y cols., 2000; Marder y cols., 2003; Fernández y cols., 2003).

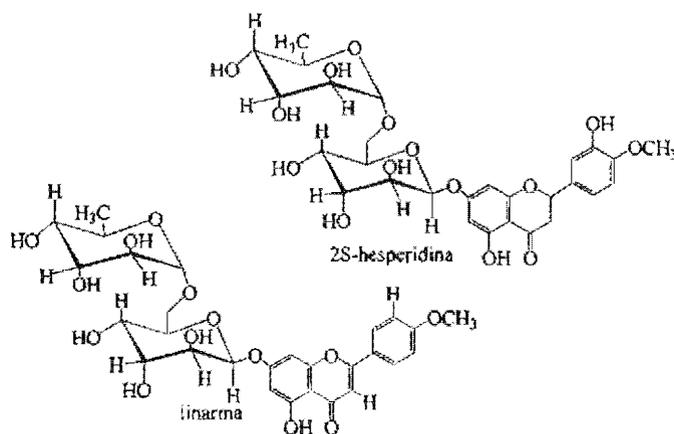


Figura 7. Rutinósidos de flavonoide con actividad sobre el SNC

Los efectos centrales que poseen los flavonoides, han propiciado una intensa investigación, para tratar de elucidar los mecanismos de acción a través de los cuales los flavonoides ejercen sus efectos, de manera que, recientemente se ha propuesto que estos metabolitos ejercen sus acciones a través de diferentes interacciones con el sistema Gabaérgico. Lo anterior ha llevado postular a los flavonoides, como un nuevo grupo de ligandos de sitios específicos del complejo GABA/BDZ (Fernández, 2005; Panthong,

2007). Estos antecedentes ponen en evidencia el potencial, de los flavonoides en la terapéutica de trastornos mentales o neurológicos como la ansiedad y/o la epilepsia.

### ➤ **Ansiedad**

La ansiedad es una respuesta normal y necesaria ante situaciones que suponen una amenaza y que estimulan al ser humano a enfrentar situaciones nuevas e inesperadas a lo largo de la vida. De esta forma, esta emoción resulta ser benéfica para el individuo al permitirle un mayor estado de alerta además de impulsarlo a realizar acciones que en circunstancias normales no haría; por lo que la ansiedad se podría definir como una respuesta adaptativa de un organismo ante un estímulo adverso o desfavorable (Pérez de la Mora, 2003). Sin embargo, se considera patológica cuando es excesiva o persistente, cuando ya no sirve para indicar un peligro o cuando su intensidad es tan alta que interfiere con el rendimiento y el funcionamiento del individuo (Heinze, 2003).

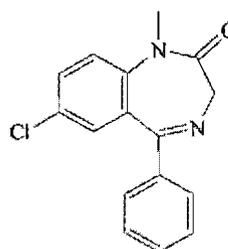
Recientemente, se ha considerado a la ansiedad, como el padecimiento mental de mayor prevalencia, afectando a más del 10% de la población general (Griez, 2000), de tal forma que numerosos expertos en salud mental la ha definido como la auténtica epidemia del siglo XXI (Heinze, 2003).

La manifestación esencial de un trastorno de ansiedad es el aumento del temor, acompañado de manifestaciones subjetivas y objetivas. Las manifestaciones subjetivas van desde un alto grado de alerta un miedo intenso a un desastre, o a la muerte inminente; mientras que las manifestaciones objetivas son aceleración de la frecuencia cardíaca, conducta de evitación y signos de inquietud, palpitaciones, temblor, sudor (Kandel, 2001).

Aunque no existe una región cerebral única encargada de la integración de trastornos como la ansiedad, se han identificado varias estructuras anatómicas del sistema límbico implicadas en este padecimiento como: la corteza cerebral, el septo lateral, la amígdala, el hipocampo y algunas regiones hipotalámicas (Pérez de la Mora, 2003).

Estas regiones cerebrales se mantienen comunicadas entre sí por medio de uno de los mecanismos biológicos de comunicación celular más complejos y eficaces: la neurotransmisión. Son varios los sistemas de neurotransmisión que subyacen a los procesos de ansiedad. Sin embargo, el GABAérgico es el principal sistema de inhibición sináptica encargado de regular los procesos de ansiedad.

En la terapéutica, las benzodiazepinas son los fármacos más eficaces para el tratamiento de los trastornos de ansiedad, siendo el diazepam (Figura 8) el más empleado en la clínica. Estos fármacos ejercen su efecto terapéutico potenciando la actividad del receptor  $GABA_A$  favoreciendo la inhibición sináptica producida por GABA (Kandel, 2001).



**Figura 8. Estructura química del diazepam**

#### ➤ Sistema inhibitor GABAérgico.

Un neurotransmisor es una molécula derivada principalmente de un aminoácido o bien del metabolismo intermediario de estos. Su síntesis es llevada a cabo por reacciones

enzimáticas que, posteriormente son almacenadas en las vesículas sinápticas terminales y liberadas por la despolarización membranal (Deutch y Roth, 1999).

El efecto inhibitorio de un neurotransmisor se ejerce cuando es capaz de deprimir o atenuar la excitabilidad neuronal y durante este proceso disminuye la probabilidad de que una neurona genere potenciales de acción. En regiones del cerebro como el hipocampo y la corteza cerebral, la inhibición se produce por circuitos neuronales locales establecidos por interneuronas de las cuales más del 90% son GABAérgicas. Estos circuitos neuronales inhiben a las neuronas de proyección (piramidales) constituyendo así, una de las regulaciones de la excitabilidad más importantes del Sistema Nervioso Central (Nurse y Lacaille, 1997; Luddens y cols., 1995).

El neurotransmisor GABA, fue descubierto por Eugene Roberts en 1950. Sin embargo, no fue hasta 1956 cuando Bazemore y cols., aislaron del tejido nervioso del langostino, una sustancia endógena o "factor I", la cual producía un efecto neural de inhibición; mostrando así, la primera evidencia que sugería que GABA era un neurotransmisor. Para 1957 se comprobó que este aminoácido, aplicado en forma directa a la corteza cerebral, tenía efectos sobre la actividad eléctrica, dando testimonio de la participación de GABA en el movimiento iónico en las neuronas (Krnjevic, 1984, 1991, 1997; Houser y cols., 1984).

Este neurotransmisor es un pequeño aminoácido de 103 Da, su nombre proviene de las siglas en inglés de su estructura química: ácido  $\gamma$ -aminobutírico y es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro en los mamíferos (Olsen y Tobin, 1990; McKernan y Whithing, 1996; Avoli y cols., 1997).

El GABA se sintetiza en las terminales nerviosas por descarboxilación del glutamato, por acción de la enzima citosólica ácido glutamático descarboxilasa (GAD),

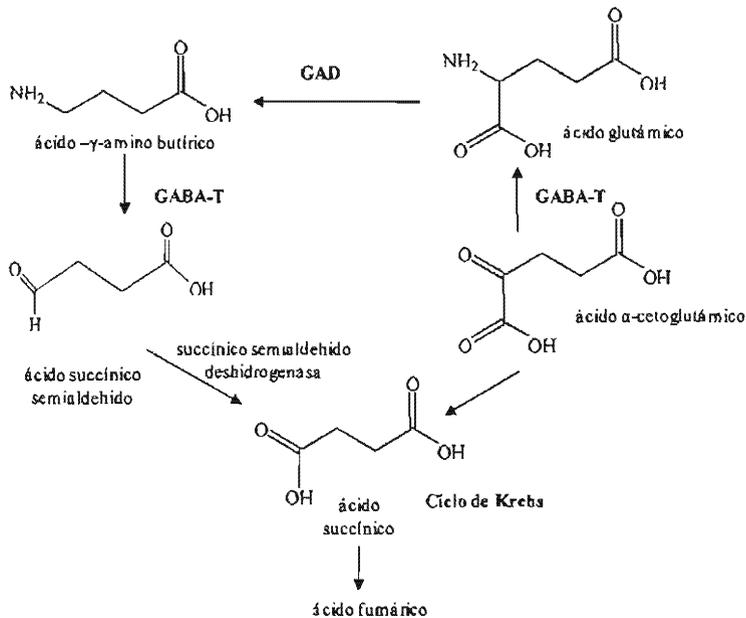
también conocida como L-glutamato-l-carboxilasa-liasa. Esta enzima se encarga del transporte o derivación del glutamato garantizando así la producción del GABA. Además, es indispensable para el control de la excitabilidad neural, ya que su disminución favorece la aparición de convulsiones; asimismo es blanco en el tratamiento de algunas epilepsias (Tapia y cols., 1975; Foster y Kemp, 2006; Wu y cols., 2007).

La mayor parte del ácido glutámico necesario para la producción del GABA no proviene del sistema sanguíneo, ya que las células neuronales poseen un mecanismo enzimático de síntesis a partir de una transaminación oxidativa debido a la  $\alpha$ -cetoglutarato transtaminasa (GABA-T), o su ruta alterna por un proceso de desaminación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa. Por lo que, de acuerdo a estos eventos metabólicos las fuentes del ácido glutámico son:

1) La transformación del  $\alpha$ -cetoglutarato; metabolito del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

2) La desaminación de la glutamina (DeLorcy y Olsen, 1994; Deutch y Roth, 1999).

Un aspecto interesante en la síntesis del GABA, es que la enzima que produce al sustrato (glutamato) también lo degrada (GAD). El GABA es transformado a semialdehído succínico (ácido- $\gamma$ -hidroxibutírico) por la GABA-T en presencia del ácido  $\alpha$ -cetoglutámico como co-sustrato para la reacción. Por lo que, la GABA-T es fundamental en la síntesis y catabolismo del GABA. Estas características hacen diferente la síntesis del neurotransmisor GABA, ya que es un derivado directo del metabolismo intermediario de la glucosa y del glutamato (Figura 9; Paul, 1995).



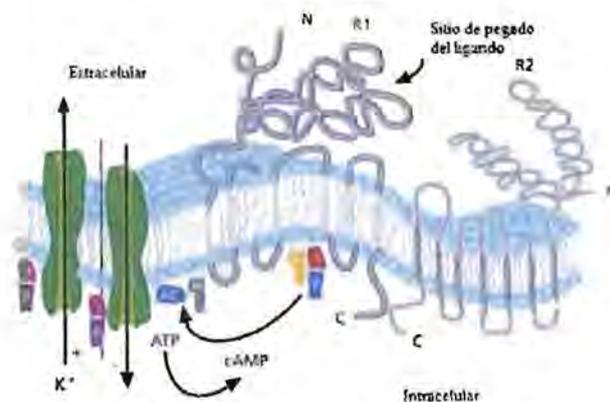
El GABA es sintetizado por la descarboxilación del ácido glutámico mediante la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). La GABA-T es la enzima que se encarga de degradar al GABA en ácido succínico semialdehído (ácido-γ-hidroxibutírico, IUPAC) para su posterior inserción al ciclo de Krebs. Así mismo, la GABA-T se encarga de proveer el sustrato para la síntesis del GABA (tomada de Paul, 1995).

**Figura 9. Diagrama de la síntesis del GABA**

### ➤ Receptores GABAérgicos

Los efectos del GABA a nivel pre y post-sináptico son consecuencia de su interacción con la membrana neural a través de proteínas receptoras. Los receptores para el GABA están divididos en dos grupos: uno de tipo metabotrópico (GABA<sub>B</sub>); asociado a segundos mensajeros vía proteínas G y nucleótidos cíclicos (AMP<sub>c</sub>), y dos de tipo ionotrópico: GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>. Sin embargo, los receptores GABA<sub>C</sub> se encuentran exclusivamente en la retina.

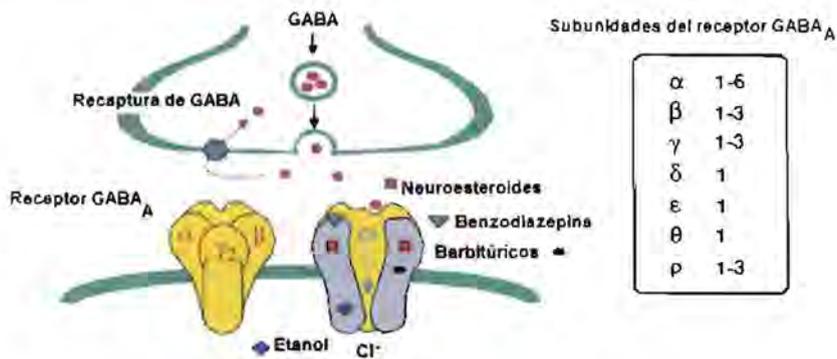
El receptor GABA<sub>B</sub> es una proteína de aproximadamente 80 kDa (Ohmori y Kuriyama, 1991), conformada por 7 segmentos transmembranales. Perteneció a la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Su agonista selectivo es baclofén y el ácido 3-amino propil fosfanato; mientras que su antagonista selectivo son el saclofén y el flaclofén. Este receptor se encuentra a nivel pre y post-sináptico, en el primero actúa disminuyendo la liberación de neurotransmisores por medio de la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes del voltaje a la terminal sináptica mediante proteínas G; mientras que en el espacio post-sináptico este receptor permite el incremento en la conductancia de K<sup>+</sup>, lo que se identifica como el fragmento lento del potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP), como se observa en la Figura 10 (Soltész y cols., 1988; Kaupmann y cols., 1997; Kerr y cols., 1987; Karlsson y cols., 1988; Thompson y Gähwiler, 1992; Deutch y Roth, 1999).



El GABA<sub>B</sub> es un receptor metabotrópico formado de dos heterodímeros cada uno de siete pasos transmembranales, acoplado a proteínas G. R1, R2 representan el sitio del pegado del ligando (GABA), al activarse el receptor pre-sináptico bloquea los canales voltaje dependientes de Ca<sup>2+</sup> y post-sináptico favorece las conductancias de K<sup>+</sup> (tomado de Purves D. y cols., 2006)

Figura 10. Esquema del receptor GABA<sub>B</sub>

El receptor GABA<sub>A</sub> está integrado por subunidades con forma de heteropentámero, de peso aproximado entre 275 a 400 kDa. Su estructura está conformada por 8 subunidades diferentes. De tal forma que, a estas proteínas se les ha denominado con las letras griegas: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ε), pi (π), rho (ρ), y teta (θ). Asimismo estas subunidades se dividen en diversos tipos: 6 diferentes subtipos de α; 3 distintas β, 3 tipos de γ, 1 forma de δ, 1 tipo de ε, 1 formas de π 3 formas de ρ, y un solo tipo de θ (Figura 11). Cada subunidad tiene su dominio N-terminal del lado extracelular (citósol), el cual puede ser el sitio ligando de varias moléculas (Havers y Luddens, 1998; MacDonald y Olsen, 1994; Sieghart, 1999; Kardos, 1999; Chebib y Johnston, 1999).



Este receptor ionotrópico es un complejo proteico alostérico reconocido por diferentes ligandos en sitios distintos. Al ser activado permite el ingreso de Cl<sup>-</sup> a la célula, lo cual favorece su efecto hiperpolarizante. Su estructura es heteropentamérica, compuesta por 7 clases diferentes de subunidades (modificado por Mohler, 2006).

Figura 11. Representación del receptor GABA<sub>A</sub>

El sitio de unión del GABA a su receptor ionotrópico es en las subunidades α y β; una vez unido el neurotransmisor a su receptor se favorece el paso de los aniones al interior

de la célula neural, con lo que se produce una hiperpolarización o un cambio en el potencial de membrana, alejando del umbral el disparo del potencial de acción.

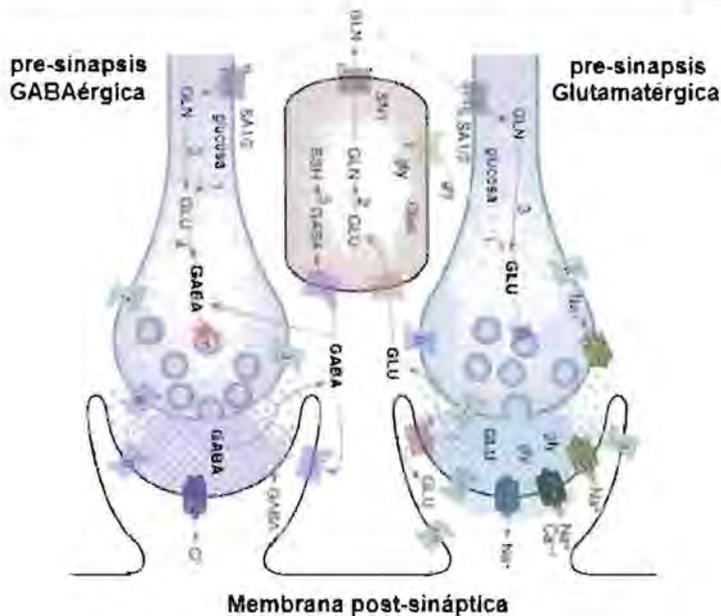
Estos sucesos se deben al cambio conformacional de la proteína receptora que la convierten en un canal (de 58 Å); este conducto presenta una marcada preferencia por el ión  $\text{Cl}^-$ , permitiendo su entrada al interior de la célula, debido a la carga positiva de los aminoácidos que se localizan en la porción final del canal.

### ➤ **Fisiología y Recaptura del GABA**

Las células nerviosas inician una respuesta ante una estimulación eléctrica o química; dentro de los eventos que se suceden, se puede identificar a las respuestas sinápticas excitadoras e inhibitoras. El primer tipo de respuesta promueve la propagación de los impulsos eléctricos, ya sea por la liberación de neurotransmisores o por la modificación de los receptores postsinápticos. Mientras que los efectos sinápticos inhibitorios, presentan mecanismos tales como: reducción en la liberación de neurotransmisores excitadores en la membrana pre-sináptica o bien reducción en la excitabilidad de la célula post-sináptica (Kuriyama, 1993).

El sistema GABAérgico tiene efecto en la membrana pre y post-sináptica y sus efectos son consecuencia de su interacción en la membrana a través de las proteínas receptoras (Figura 12). El mecanismo de inhibición presináptica inicia con la disminución en el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ , catión involucrado en la maquinaria de liberación de neurotransmisores en la terminal nerviosa. A nivel post-sináptico el mecanismo se debe a un incremento en la conductancia de  $\text{Cl}^-$ , con lo cual la membrana neuronal presenta un

efecto hiperpolarizante; esta cadena de eventos post-sinápticos es designada como potencial post-sináptico inhibitor (IPSP) (Borman, 1988; Krnjevic, 1991 y 1997).



En el diagrama se observa a la izquierda la neurotransmisión GABAérgica. La glutamina (GLN) es capturada por la glía (se aprecia al centro) por medio de su transportador específico (SN1) o en la terminal pre-sináptica por la SA 1/2. La GLU también puede ser un metabolito intermediario de la oxidación de la glucosa (transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato, paso 1). El glutamato (GLU) se transforma en GABA por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, paso 4). El GABA es catabolizado por la enzima succinato deshidrogenasa en succinato semialdehído (SSH; paso 5). El efecto de esta neurotransmisión es inducir una disminución de la actividad neuronal. En contraste, a la derecha se distingue la neurotransmisión excitatoria dependiente de GLU; sus efectos se explican debido a que este neurotransmisor incrementa la conductancia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , generando una despolarización post-sináptica (tomado de Foster y Kemp, 2006).

**Figura 12. Diagrama fisiológico de los dos sistemas de neurotransmisión más importantes del SNC.**

Después de ser liberado por la terminal nerviosa, el GABA es capturado nuevamente por las neuronas y por la glía. Su recaptura es el mecanismo primario de la

inactivación de su efecto; además depende del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$ , por lo que depende de la actividad de la  $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$ .

Se han clasificado cuatro distintos transportadores transmembranales de GABA la GAT1, 2, 3 y 4, siendo la GAT-1 y 4 los que se encuentran en las terminales GABAérgicas; esta característica permite que su distribución sea amplia en todo el SNC. El transportador GAT-2 se localiza principalmente en la glía, mientras que la GAT-3 se expresa en el leptomeninge y el plexo coroideo (Foster y Kemp, 2006).

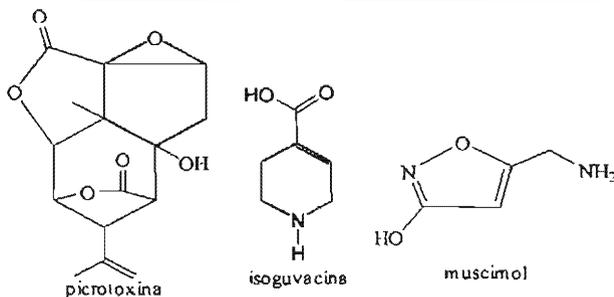
#### ➤ **Modulación del $\text{GABA}_A$**

El receptor  $\text{GABA}_A$  es una proteína alostérica; ya que sus propiedades como receptor pueden ser moduladas por la unión de otros compuestos que no se unen al mismo sitio que reconoce al GABA. Ciertos fármacos hacen más eficiente la transmisión GABAérgica, incrementando la frecuencia de apertura del canal o cambiando el tiempo de apertura del mismo. Algunas moléculas alostéricas son los neuroesteroides, el alcohol, los barbitúricos y las benzodiazepinas (Hadingham y cols., 1992 McKernan y Whiting, 1996).

Las BDZ son moléculas que modulan las corrientes del ión  $\text{Cl}^-$  incrementando la frecuencia de apertura del canal, pero no la duración de los estados abiertos, el efecto alostérico de estas moléculas es observable con la presencia del GABA. Estos fármacos tienen su sitio de unión en el receptor entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ; aunque, quien confiere la afinidad por las mismas es la subunidad  $\gamma$ , principalmente el subtipo 2 ( $2\gamma$ ). Mientras que los barbitúricos alteran las corrientes GABAérgicas amplificando el tiempo de apertura del poro; además presentan una acción dual ya que a concentraciones pequeñas su efecto depende de la presencia de GABA, entretanto a dosis grandes depende exclusivamente del

barbitúrico. Su sitio de interacción son las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor (McDonald y Olsen, 1994; Kardos, 1999).

Otros tipos de moléculas que interaccionan con este receptor son la bicuculina un potente convulsionante, el cual disminuye la unión del GABA al receptor de manera competitiva; otro caso es la picrotoxina, que se une aparentemente al poro del canal previniendo el flujo de iones, bloqueando la apertura del canal; estos compuestos actúan como antagonistas; mientras que los agonistas selectivos de este receptor son la isoguvacina y el muscimol (Figura 13).



**Figura 13. Algunas moléculas que interactúan con el receptor GABA<sub>A</sub>**

La neurotransmisión GABAérgica tiene un papel predominante en la fisiopatología de diversos trastornos neuronales como la epilepsia, ansiedad, síndromes de abstinencia, sedación, así como trastornos del sueño, entre otros. Estos padecimientos tienen un factor común: el incremento de la excitabilidad neural, esta hiperexcitabilidad es consecuencia de alguno de los siguientes eventos que pueden presentarse como uno solo o bien, actuar de forma conjunta: modificación en la síntesis de GABA, disminución en su liberación, cambios en el proceso de recaptura, modificación en la estructura del receptor y cambios en la afinidad del receptor GABA

Los avances y descubrimientos de la fisiología, la bioquímica y la farmacología del sistema GABAérgico, han abierto una puerta para la búsqueda de moléculas que modulen la actividad de estos receptores, sin modificar o alterar la neurotransmisión, síntesis, recaptura o estructura de los receptores. De manera que, el descubrimiento de moléculas alostéricas moduladoras podría revolucionar el tratamiento de los trastornos mentales que aquejan a un sector importante de la población. De aquí la importancia de realizar estudios farmacológicos de plantas empleadas en la medicina popular, puesto que estas son fuente de moléculas con potencial aplicación en la terapéutica de los trastornos mentales.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han mostrado ser una importante fuente de moléculas bioactivas, por lo cual, resulta importante realizar estudios farmacológicos para caracterizar moléculas con potenciales efectos sobre el SNC, obtenidas a partir de plantas medicinales con reconocidas propiedades sedantes, como es el caso del *Agastache mexicana* subesp *mexicana*.

#### IV. OBJETIVOS

- ✓ Evaluar el efecto sedante de la 7-*O*-glucosilacetina en el modelo de tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.
  
- ✓ Evaluar el efecto sedante de la 7-*O*-glucosilacetina en un modelo animal de conducta del tablero con perforaciones.
  
- ✓ Evaluar la actividad anticonvulsiva de la 7-*O*-glucosilacetina, en el modelo de convulsiones inducidas químicamente.
  
- ✓ Evaluar la susceptibilidad/inhibición producida por la 7-*O*-glucosilacetina en el modelo electrofisiológico de potencial de campo post-sináptico excitatorio.

## V. HIPÓTESIS

Con base a los antecedentes químicos y biológicos de los glucósidos de flavonoide y mediante una aproximación química es factible suponer que la 7-*O*-glucosilacetina, posea propiedades sedantes en ratones y produzca un incremento en la inhibición neural debido a su posible interacción con el sistema GABAérgico.

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

Este estudio se realizó con cuatro técnicas distintas:

- 1) Aislamiento y caracterización de la 7-O-GAC
- 2) Prueba de prolongación del tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.
- 3) Determinación de los efectos sedantes y/o ansiolíticos de la 7-O-GAC en el modelo del tablero con perforaciones.
- 4) Determinación de la actividad antiepiléptica de la 7-O-GAC en el modelo de convulsiones inducidas químicamente por pentilentetrazol.
- 5) Preparación de rebanadas de cerebro para medir la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo de rata.

### ➤ **Fármacos y sustancias:**

Los fármacos y sustancias empleadas en este trabajo fueron obtenidos del laboratorio Sigma-Aldrich (St. Louis, MO. USA), las soluciones de los fármacos preparados antes de iniciar cada experimento en una relación de 10mL por kg de peso de animal, la administración se realizó vía intraperitoneal, con una latencia de administración de 60 min.

- 7-O-glucosilacaetina (7-O-GAC) fue aislado en el Laboratorio de Fitofarmacología del INPRF.

### ➤ **Animales:**

En la pruebas conductuales, se utilizaron ratones macho Swiss Webster de 6-8 semanas de edad y 25-30 g de peso, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio del INPRF. Los animales fueron resguardados en un cuarto con temperatura controlada entre 20-22 °C, colocados en grupos de 8 por caja, con libre acceso a comida y agua. Bajo ciclo de luz/ oscuridad invertido de (12h /12h). Los animales de prueba fueron habituados en el cuarto de experimentación durante la semana previa a los ensayos, para permitir su adaptación al nuevo ambiente y disminuir su estrés.

Para la evaluación del potencial post-sináptico excitatorio, se utilizaron ratas macho de la cepa Winstar con peso aproximado de 250-300 g; mantenidas en condiciones de temperatura constante (20-25 °C), con alimento y agua *ad libitum*, y bajo ciclo de luz/ oscuridad invertido (12h /12h).

El manejo de los animales se realizó conforme a las normas oficiales: NIH No. 85-23 (National Institutes of Health; USA) revisada en 1985 y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y contó con la aprobación del comité de ética del INPRFM.

### **I. Aislamiento y caracterización de la 7-O-GAC:**

El material vegetal de *A. mexicana* subsp *mexicana* fue colectado en San José Tlacotitlán, municipio de Ozumba, Estado de México. La identificación botánica la realizó el Dr. Robert Bye y una muestra del material vegetal fue depositada en el Herbario del Instituto de Biología, UNAM (MEXU No. 1120)

Las partes aéreas secas y molidas (1000 g) de *Agastache mexicana* subesp *mexicana*, se extrajeron de forma sucesiva en hexano (5 L), acetato de etilo (5 L) y

finalmente con metanol (5 L), los tres extractos fueron filtrados por separado y los disolventes se evaporaron a presión reducida y los extractos fueron trabajados por separado.

Se obtuvieron 100.02 g del extracto metanólico (10.02% en relación al peso seco del material vegetal inicial) éste extracto fue separado en sus componentes, mediante cromatografía en columna al vacío, empacada con sílica gel 60G F<sub>254</sub>, Merck en una proporción de 1:15 con respecto al peso del extracto, utilizando como eluyente hexano, mezclas de hexano-AcOEt, de polaridad creciente, AcOEt, mezclas de AcOEt-MeOH y MeOH. De las fracciones eluidas con AcOEt, se obtuvieron 30.15 g (de un sólido amarillento, el cual fue nuevamente sometido a cromatografía en columna, empleando el mismo sistema de elusión. De las fracciones polares se obtuvieron, por precipitación y posteriores recristalizaciones 5.2g de 7-O-glucosilacetina, como un sólido blanco, con p.f.= 230-233 °C. La identidad del producto fue confirmada por sus características de RMN<sup>1</sup>H y espectrometría de masas (FAB<sup>+</sup>) y por su comparación con las descritas en la literatura.

Adicionalmente, la pureza del producto fue confirmada, mediante un análisis de CLAR-EM, utilizando un Cromatógrafo Waters modelo 600, con un detector de UV-vis, acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Esquire modelo 6000.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna Synergi Polar-RP 150 mm × 2.0 mm y DI = 4µm, Utilizando como fase móvil un sistema de acetonitrilo-agua (10:90 v/v por 30 min) con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min, el volumen de inyección fue de 5 µL de 7-O-GAC en solución acuosa concentrada, la temperatura del sistema se mantuvo a 25 °C y la longitud de onda de detección fue de 254 nm.

A partir de la columna de elusión se adquirió el espectro de iones positivos de 7-O-GAC (Estrada y cols., 2009).

## **2. Prueba de prolongación del tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.**

Esta prueba se empleó para evaluar el efecto sedante e hipnótico en grupos de 8 a 10 animales para cada tratamiento. Su desarrollo consistió en dos etapas experimentales: en la primera se administró vía ip las dosis correspondiente del principio activo; para el caso la 7-O-GAC (ver Apartado I. Diseño experimental). Después de 60 min. se administró por la misma vía 42 mg/kg de PB e inmediatamente fueron colocados de forma individual en una caja de acrílico de 30 × 21 × 21 cm que contenía una cama de aserrín fino y fueron observados cuidadosamente hasta su recuperación total. Los controles fueron administrados con solución salina (ss) y Tween® 80, y 60 min después se administró PB (42 mg/kg). (Ver Apartado I Diseño experimental).

En cada caso se registraron tanto los tiempos de latencia de sedación; considerada como el tiempo en minutos que transcurrió entre la administración de PB y la pérdida de la coordinación locomotriz; tiempo de latencia de hipnosis, siendo el tiempo transcurrido desde la administración del PB hasta la inmovilidad total sin la pérdida del reflejo de enderezamiento. Finalmente se evaluó el tiempo de sueño, siendo el tiempo que transcurre entre la pérdida del reflejo de enderezamiento y su recuperación.

### 3. Evaluación de los efectos sedantes y/o ansiolíticos en el modelo del tablero con perforaciones.

Este modelo evaluó el efecto ansiolítico y/o sedante de la 7-O-GAC. El aparato consistió en una caja de plexiglás de 60 × 60 cm, con paredes de 10 cm de alto (sin superficies reflejantes), cuyo piso tenía 4 perforaciones equidistantes, de 2 cm de diámetro.

A los animales se les administró por vía ip las dosis correspondientes del principio activo (Apartado I Diseño experimental). Transcurridos 60 min, se inició la prueba colocando al sujeto experimental en el centro del tablero, observando la conducta exploratoria del animal durante 5 min. En este periodo se evaluó el número de veces que introduce la cabeza en cualquiera de las perforaciones (NA), el tiempo total de exploración, siendo el tiempo total en que el ratón mantiene la cabeza dentro de alguna de las perforaciones (TA) y el número de veces que se para en sus patas posteriores (NP). Después de cada prueba la caja se limpió cuidadosamente con una solución limpiadora especial, para eliminar rastros que pudieran afectar el comportamiento del siguiente animal.

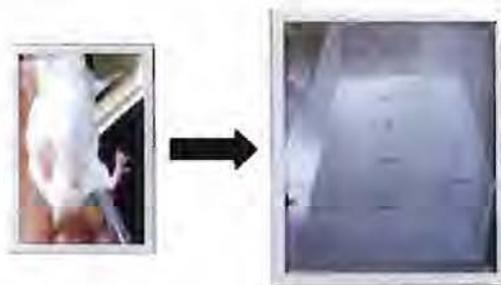


Figura 14. Modelo de tablero con perforaciones.

La disminución de estas variables con respecto al control, en este modelo es considerado un efecto sedante, un aumento en estas variables sin modificar la actividad locomotriz es considerado como un efecto ansiolítico; mientras que una disminución de las mismas, acompañado de un aumento en la actividad locomotriz puede ser considerado como un efecto ansiogénico (Marder y Viola, 2003; Estrada-Reyes y cols., 2009).

#### **4. Evaluación de los efectos anti-convulsivos de la 7-O-GAC en el modelo de convulsiones inducidas químicamente.**

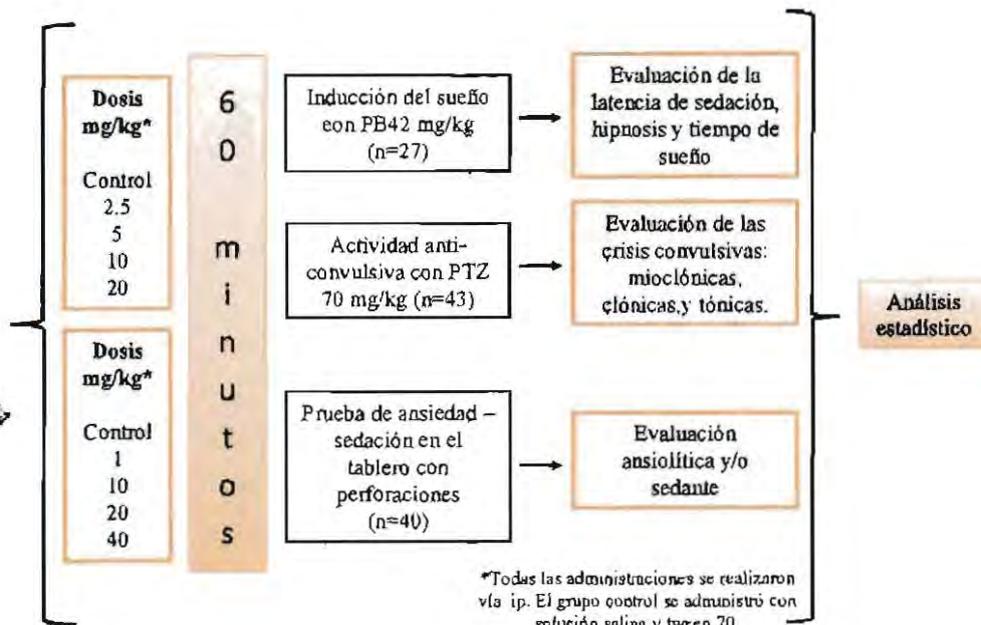
La evaluación del efecto anti-convulsivo se realizó en el modelo de actividad convulsiva inducida con pentylenetetrazol (PTZ). Los animales se administraron vía ip de forma individual con la 7-O-GAC a las dosis de 2.5, 5.0, 10.0 o 20.0 mg/kg y 60 min después, fueron administrados por la misma vía con 70 mg/kg de PTZ.

Inmediatamente después los animales se colocaron de manera individual dentro de una caja de acrílico de 44 × 22 × 21 cm, que contenía una cama de aserrín fino y fueron observados cuidadosamente hasta su total recuperación o muerte. Se registró el tiempo de latencia de la primera crisis (el tiempo que transcurre entre la administración del PTZ y la aparición de la primera crisis) y el tiempo de latencia de las crisis clónicas-tónicas generalizadas (como el tiempo que transcurre entre la administración de PTZ y la aparición de crisis severas), en las cuales se pueden observar caídas, clonias y extensión tanto de las patas delanteras como traseras. Ambas conductas fueron medidas en minutos. El grupo de animales que sirvió como se trató de la misma forma, sólo que en lugar del principio activo se administró con el vehículo (Apartado I. Diseño experimental).



**Figura 15. Modelo de actividad convulsiva inducida químicamente.**

Apartado I. Diseño experimental para la evaluación de la 7-O-GAC en modelos animales de conducta



## 5. Determinación de la actividad sináptica en el área CA1 del hipocampo, inducida por 7-O-GAC.

Datos previos sobre esta línea de investigación, muestran que fenómenos hiperexcitabilidad en el animal íntegro pueden cuantificarse en condiciones *in vitro*. Por lo que el registro de la actividad sináptica en rebanadas de cerebro es un método que garantiza la conservación de los componentes sinápticos así como la identificación precisa de los elementos y estructuras del cerebro, además permite mantener un control específico de la estimulación en fibras/axones, así como de las regiones o núcleos de registro (Calixto y cols., 2000).

En esta serie de experimentos los animales íntegros, fueron anestesiados con una dosis de 50mg/kg de peso de pentobarbital sódico (Anestesia®). Posteriormente, fueron perfundidos con un catéter a nivel del ventrículo izquierdo del corazón con una solución a base de sacarosa a temperatura de 4 °C (composición en mM: sacarosa 229, KCl 2.0, glucosa 10, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 26, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgCl<sub>2</sub> 1.5), burbujeada con una mezcla de gases O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%, con la cual se mantiene un pH constante de 7.4.

Al término de la perfusión, el cerebro fue extraído rápidamente. Cada hemisferio se seccionó en un vibratomo (pelco M-101), con rebanadas sagitales de 400µm de grosor a una temperatura de 4 °C. Las rebanadas obtenidas se mantuvieron en una solución salina con una composición semejante a la del líquido cefalorraquídeo (concentraciones en mM: NaCl 125, KCl 2.0, MgCl<sub>2</sub> 6.0, CaCl<sub>2</sub> 1.0, glucosa 11, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 26; con un burbujeo continuo con la mezcla de gases O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%), ajustado a un pH de 7.4 y una osmolaridad de 300 mOsmol/L. El registro de la actividad electrofisiológica se realizó en una cámara de perfusión continua (2.5 mL, con una velocidad de perfusión de 2 mL/min a la temperatura ambiente. La solución de

registro estándar contenía: NaCl 125 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucosa 11 mM, y Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 26 mM; con un burbujeo continuo de la mezcla de gases (O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub>) y pH de 7.4.

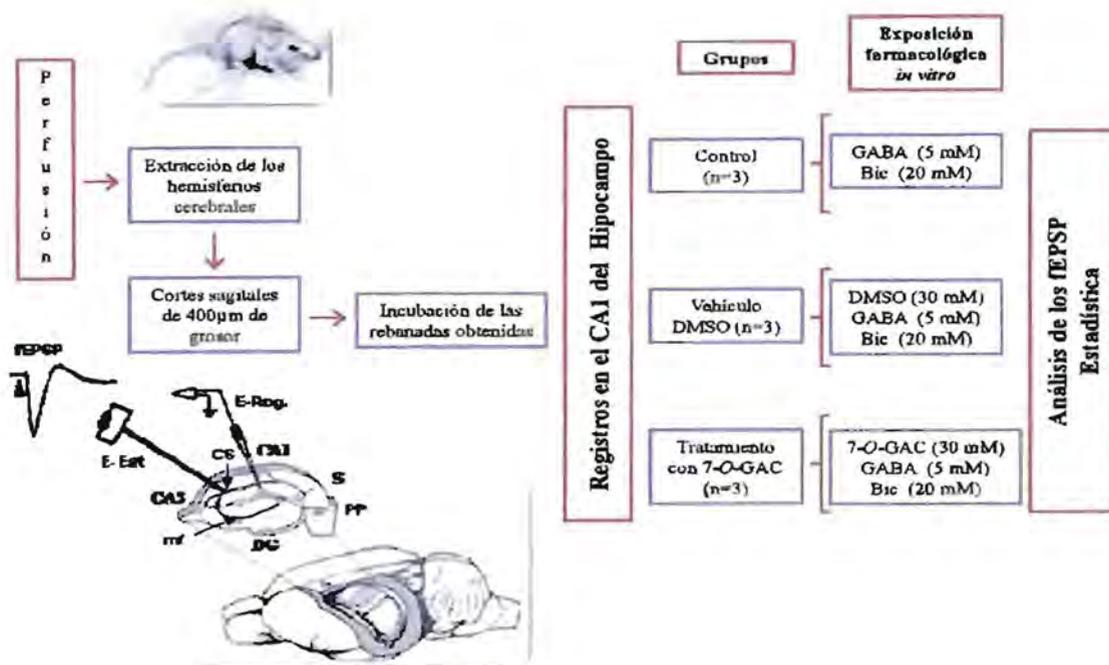
Los registros de los potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSP) se realizaron en el área CA1 del hipocampo, en el *stratum radiatum*, por medio de micropipetas de vidrio llenas con solución de NaCl al 0.9% (2-4 M; amplificador Axoclamp 2B, axón instrument). Los fEPSP fueron digitalizados y almacenados en computadora utilizando el programa pClamp V9.2 de Axoclamp Instruments.

Los estímulos para provocar los fEPSPs se realizaron con un electrodo bipolar concéntrico en las colaterales de Shaffer, mediante pulsos cuadrados de voltaje únicos (0.40-1.0 ms a 0.1Hz; estimulador Grass S-11, unidad de aislamiento Grass PSI U6), así como pulsos pareado: 10 a 60 ms en intervalos crecientes de 10 ms. La estimulación se ajustó en todos los experimentos para obtener un fEPSP con amplitud de 50-60% de la amplitud máxima. Estos protocolos no indujeron depresión o espigas múltiples, ni potenciaron la respuesta en las condiciones control.

Los grupos que se realizaron fueron (Apartado II Diseño experimental):

- 1) Grupo control en el que se verificó el efecto de GABA (5 mM) y bicuculina (Bic: 20μM) (n=3)
- 2) Grupo tratado con vehículo (DMSO) (n=3).
- 3) Grupo tratado con 7-O GAC (n=3)

Apartado II. Diseño experimental para la evaluación de la actividad sináptica en el área CA1 del hipocampo inducida por 7-O-GAC



## ➤ Análisis Estadístico

Los experimentos conductuales se realizaron con poblaciones de 8 a 10 ratones, por dosis y los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar medio. Cuando los resultados cumplieron con la prueba de normalidad, la comparación de estadística entre los grupos experimentales y los grupos control se realizó, mediante un análisis de varianza de una sola vía, seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ). Cuando los datos no cumplieron con los criterios de normalidad las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba pareada de  $U$  de Mann-Whitney (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ). Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en el programa Sigmastat 2.0 y Sigmaplot 2.0 respectivamente.

Para el análisis de cada experimento (control, vehículo DMSO y 7-O-GAC), las respuestas se normalizaron al 100% del valor de amplitud promedio de los fEPSPs en los 5 min iniciales de cada experimento o línea base. Para la evaluación del efecto de bicuculina en cada uno de los experimentos se normalizó al 100% el promedio de la amplitud antes de la aplicación del antagonista (15 min previos a la exposición de la Bic). La intensidad de la estimulación se ajustó para todos los experimentos para obtener un fEPSP con amplitud del 50-60% de la amplitud máxima.

El análisis estadístico se llevó a cabo validando la diferencia entre los promedios normalizados de la amplitud de los fEPSPs  $\pm$  su error estándar, identificando el porcentaje de cambio en esta amplitud en el curso temporal de los experimentos. Utilizando la prueba  $t$  de Student (pareada y no pareada, según el caso) y la prueba varianza no paramétrica  $U$  de Mann-Whitney, considerando una significancia al valor de  $p \leq 0.05$ .

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y caracterización de 7-O-GAC

La 7-O-glucosilacetina (5.2 g) representada en la Figura 16; se obtuvo de las fracciones polares del extracto metanólico, como un sólido blanco con p.f.= 230-233 °C. La identidad del producto fue confirmada por sus características de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y espectrometría de masas, mediante la técnica FAB<sup>+</sup>, las cuales son descritas a continuación:

**EM:** FAB<sup>+</sup>, [M<sup>+</sup> + 1], a m/z = 447, requiere una fórmula molecular: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub> (anexo 1)

**RMN <sup>1</sup>H:** (300 MHz, DMSO), δ (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 13.3 (1H, s, OH), 8.07 y 7.14 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.96 (1H, s, H-3), 6.86 y 6.46 (2H, sistema AB, 1.8 Hz, H-8 y H-6), 5.40, 5.07 y 4.62 (4H, s, OH glucosa), 5.07 (1H, d, H-2 glucosa), 3.87 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>) y 3.735-3.2121 (5H, varias señales, protones del anillo de glucosa) (anexo 1).

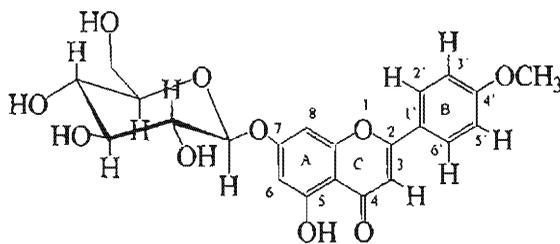


Figura 16. 7-O-glucosilacetina

En la Figura 17, se muestra el perfil en CLAR de la 7-O-GAC, la cual se obtuvo con 98.3 % de pureza, con un tiempo de retención de 16.4 min.

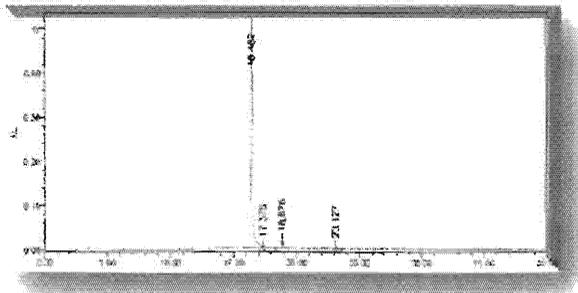


Figura 17. Perfil de CLAR de la 7-O-GAC

El espectro de iones adquirido a este tiempo de retención (TR = 16.4 min) confirmó la identidad de la 7-O-GAC (Figura 18), en el cual se observa un  $M^+ + H$  a  $m/z = 447$  que corresponde a una fórmula  $C_{22}H_{22}O_{10}$ .

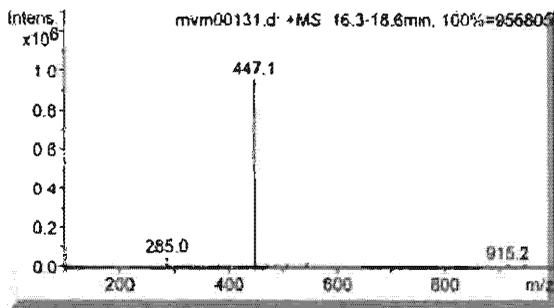


Figura 18. Masa molecular + 1 [ $M^+ + H$ ] de la 7-O-GAC

### Evaluación farmacológica de la 7-O-GAC

Los modelos animales de conducta son herramientas experimentales útiles para la investigación y el estudio de los efectos de nuevos fármacos o principios activos con potencial aplicación en el tratamiento de trastornos como insomnio o trastornos del sueño. Los efectos de la 7-O-GAC fueron evaluados en el modelo de prolongación del tiempo de

sueño inducido por PB. En esta prueba se estudió el efecto sedante producido por la 7-O-GAC a las dosis de 5, 10 y 20 mg/kg de peso. Como se representa en la tabla 1, la administración de 7-O-GAC no produjo cambios significativos en el tiempo de latencia de sedación ni en el tiempo de hipnosis (H= 1.955, gl= 3; H= 2.95, gl= 3, respectivamente), con respecto al control. Sin embargo, a la dosis de 10 mg/kg produjo un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de sueño inducido por PB, con respecto al grupo control (H= 15.38, gl= 3, p= 0.003).

**Tabla 1. Resultados obtenidos en el modelo de prolongación del tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico.**

Dosis (mg / kg)	Latencia de sedación (min)	Latencia de hipnosis (min)	Tiempo de Sueño (min)
<b>Control</b>	1.42±0.06	2.08±0.31	<b>15.53±1.75</b>
<b>5</b>	1.43±0.12	2.18±0.15	<b>19.45±2.71</b>
<b>10</b>	1.83±0.23	2.44±0.24	<b>37.01±2.13***</b>
<b>20</b>	1.60±0.20	2.48±0.22	<b>19.82±1.36</b>

Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar medio. Animales por dosis (n= 7). Prueba *post hoc* (prueba de Tukey) \*\*\*p<0.001.

Lo anterior indica que la 7-O-GAC, ejerció un efecto sedante en los animales de prueba la dosis de 10 mg/kg. Es importante mencionar que la 7-O-GAC a las dosis de 5 y 20 mg/kg produjo una disminución significativa de la actividad ambulatoria de los sujetos experimentales, lo cual puede indicar que la 7-O-GAC produce un efecto depresor del SNC.

Los efectos depresores producidos por la 7-O-GAC, fueron confirmados cuando ésta se evaluó en el modelo del tablero con perforaciones, el cual es útil para evaluar los efectos ansiolíticos y/o sedantes producidos por fármacos o principios activos. Este modelo se basa en la conducta natural de los roedores a explorar zonas desconocidas o novedosas.

En este modelo la conducta exploratoria de los roedores es determinada por el número de paradas y asomadas. Como se representa en la Figura 19a, la 7-O-GAC produjo una disminución estadísticamente significativa en el número de paradas de los grupos experimentales con respecto al control ( $F=24.41$ ,  $gl= 4, 31$ ), y de forma similar produjo una disminución en el número de asomadas (Figura 19b;  $F= 2.57$ ,  $gl= 4, 31$ ), lo anterior confirma el efecto sedante producido por la 7-O-GAC, es interesante notar que la dosis de 10 mg/kg de la 7-O-GAC, produjo una mayor disminución de la conducta exploratoria.

Figura 19a

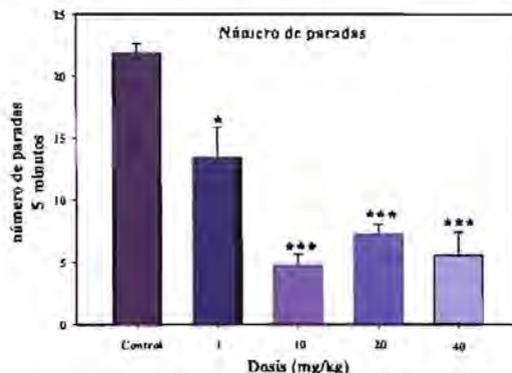


Figura 19b

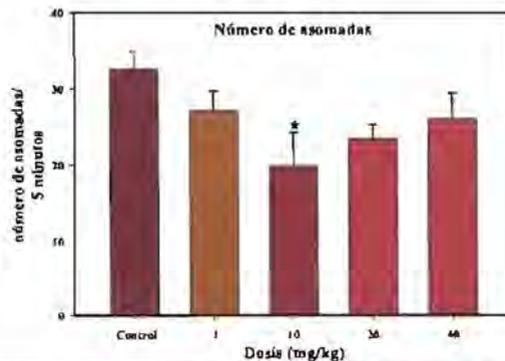


Figura 19. Efecto de la 7-O-GAC, en el NP (19a) y el NA (19b),  $n=8$ . Prueba *post hoc* de Tukey \* $p \leq 0.05$  y \*\*\* $p \leq 0.001$  en el modelo del tablero con perforaciones.

Otra variable evaluada fue el tiempo de asomadas (tiempo de exploración) como se representa en la Figura 20a, la 7-O-GAC produjo una disminución en esta respuesta, únicamente a la dosis de 10 mg/kg ( $F= 4.206$ ,  $gl= 4, 31$ ). Finalmente en la figura 20b se representa la actividad ambulatoria de los sujetos experimentales, como se puede observar la 7-O-GAC produjo una disminución en esta respuesta. Sin embargo, únicamente a la dosis de 10 mg/kg esta reducción fue estadísticamente significativa ( $F= 17.502$ ,  $gl= 4, 31$ ).

Figura 20a

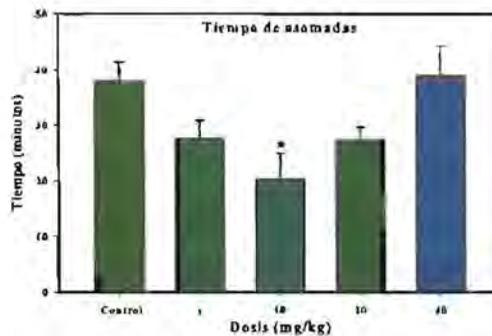


Figura 20b

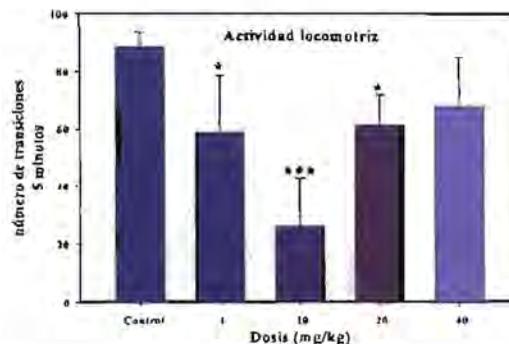


Figura 20. Evaluación de la 7-O-GAC en la ACT-L (Figura 20a) y en el TA (Figura 20b),  $n=8$ . Prueba post doc. (Tukey) \* $p \leq 0.05$  y \*\*\* $p \leq 0.001$  en el modelo del tablero con perforaciones.

Estos resultados en su conjunto muestran que la 7-O-GAC ejerce un efecto sedante en los roedores, a la dosis de 10 mg/kg.

En cuanto a la actividad epiléptica inducida por PTZ, como se muestra en la tabla 2, la 7-O-GAC no evitó ni retardo la aparición de las crisis, observándose únicamente un aumento en los tiempos de latencia a la dosis de 5 mg/kg. La 7-O-GAC no presentó un efecto antiepiléptico a las dosis evaluadas.

**Tabla 2. Resultados del modelo de Inducción de convulsiones con PTZ**

Dosis (mg/kg)	primeras crisis (min)	crisis continuas (min)
control	0.98 ± 0.02	1.26 ± 0.08
2.5	0.88 ± 0.05	1.84 ± 0.05***
5	1.24 ± 0.06**	2.81 ± 0.3**
10	0.90 ± 0.08	1.29 ± 0.1
20	0.84 ± 0.06	1.15 ± 0.08

Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar medio (n=7).  
Prueba *post hoc* (prueba de Tukey) \* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01 \*\*\* p ≤ 0.001

### Estudio de los cambios electrofisiológicos inducidos por 7-O-GAC en el área CA1 del hipocampo.

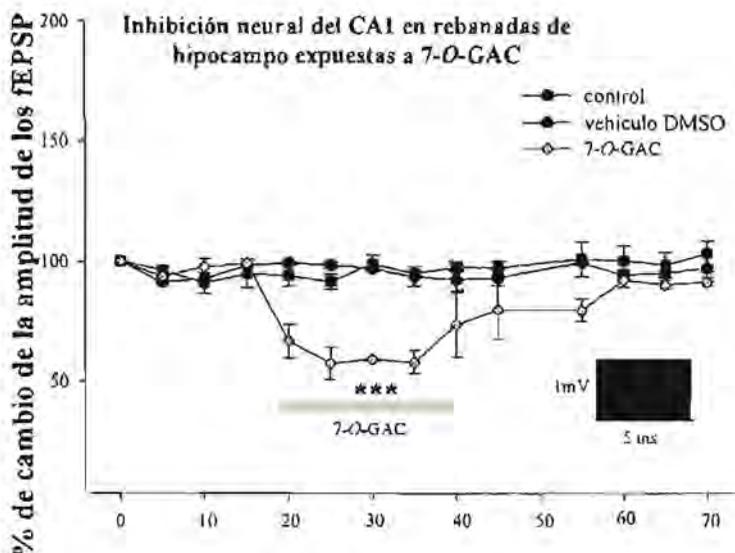
El hipocampo representa la estructura extracortical con mayor factibilidad de identificar y de valorar cambios en la neurotransmisión GABAérgica, debido a su fácil acceso e interpretación de resultados que a partir de él se obtiene. Esto obedece a dos aspectos básicos: a) el conocimiento de los tipos de componentes neuronales que lo forman y b) su conexión entre ellos (componente sináptico neurotransmisores y receptores). Es así,

que el hipocampo constituye electrofisiológica y farmacológicamente un excelente circuito neuronal funcional para medir los cambios de la inhibición/excitación. Debido a que en la primera parte de esta tesis se evaluó el efecto de la 7-O-GAC en modelos animales de conducta, nuestro siguiente propósito fue establecer el mecanismo de acción de la 7-O-GAC, utilizando para ello un correlato anatómico y electrofisiológico del sistema de neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo.

Con el objetivo de verificar si la 7-O-GAC interactúa con la neurotransmisión GABAérgica. En rebanadas de cerebro se registró la actividad sináptica del *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo con un protocolo de estimulación estándar en las colaterales de Shaffer (frecuencia 0.01 Hz e intensidad a 50-60% de la respuesta máxima). Este patrón de estimulación evocó los fEPSP, los cuales fueron estables en su morfología y amplitud en un periodo de 2 h de registro en rebanadas control (Figura 21, círculos negros; n=3). Del mismo modo, el grupo expuesto al DMSO (vehículo) no modificó el patrón de registro en la evolución temporal; ya que este grupo no presentó ningún incremento o disminución en la amplitud de la respuesta sináptica durante los 15 min en que se mantuvo la exposición manteniendo un porcentaje de amplitud de  $94.7 \pm 2.9\%$ .

En contraste, las rebanadas de hipocampo que fueron expuestas con la 7-O-GAC, la actividad sináptica fue disminuida en su amplitud. Los fEPSP durante los 15 minutos en los que se mantuvo la superfusión de la 7-O-GAC redujo la amplitud hasta el  $60.1 \pm 4.7\%$ , como se representa en la Figura 21. Esta disminución en la amplitud de los fEPSP fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.001$ ) comparado con el grupo control y con el grupo expuesto al DMSO (vehículo) representados en la misma Figura.

Figura 21

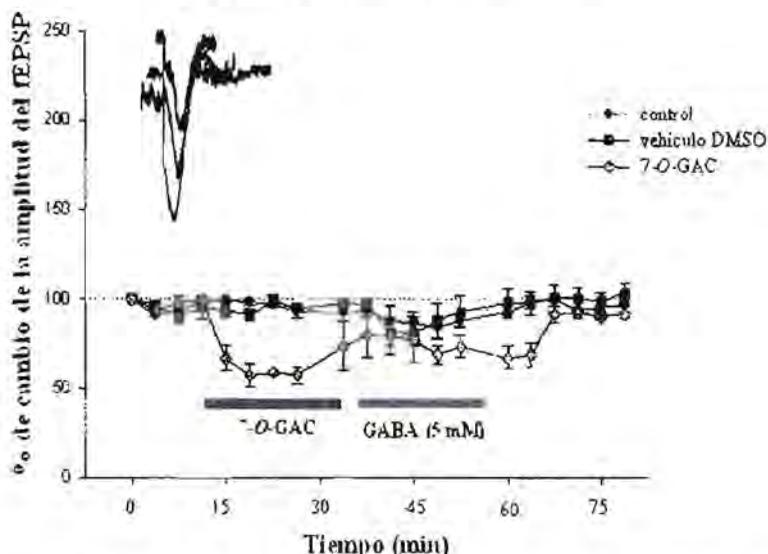


La 7-O-GAC induce una inhibición de la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo *In vitro*. La administración de la 7-O-GAC en la perfusión evoca una disminución en el porcentaje de amplitud de fEPSP, (rombos verdes; n=3), grupos: control (círculos negros, n=3) y DMSO (cuadros azules, n=3). Los registros del panel superior son característicos de la actividad registrada en el hipocampo

Los resultados de este estudio sugieren que la 7-O-GAC ejerce sus efectos sedantes en ratones, debido a que produce un incremento significativo en la actividad GABAérgica del hipocampo. En contraste, las rebanadas control (Figura 22, círculos negros) o expuestas a DMSO (Figura 22, cuadros azules) y posteriormente expuestas al GABA (5mM), se observa una inhibición propiciada por el neurotransmisor del  $86.6 \pm 5.7\%$ ; mientras que el grupo experimental expuesto a 7-O-GAC (Figura 22, rombos verdes) y posteriormente a GABA presentó un cambio de  $74.8 \pm 8.5\%$  el cual es estadísticamente significativo al porcentaje de cambio respecto al grupo control expuesto al neurotransmisor ( $p \leq 0.007$ ).

Figura 22

**Inhibición neural del CA1 en rebanadas de hipocampo expuestas a 7-O-GAC**



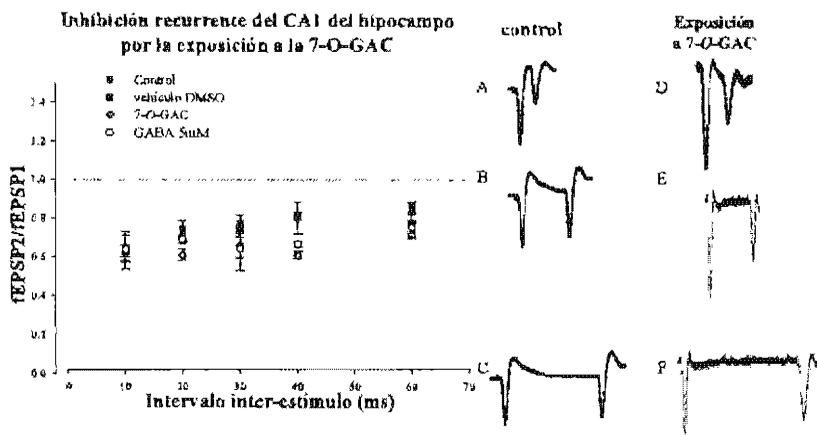
Incremento de la actividad en el área CA1 del hipocampo inducida por la 7-O-GAC y por GABA (5 mM), (rombos verdes, n=3), comparado el grupo control (círculos negros, n=3) y el grupo de DMSO expuesto al mismo neurotransmisor (cuadros azules, n=3).

En el hipocampo, el ingreso de la información excitatoria al área CA1 siempre se asocia a un fuerte control inhibitorio de interneuronas GABAérgica que impiden: a) la aparición de descargas epilépticas, b) la activación de circuitos reverberantes y c) el reclutamiento asincrónico de poblaciones neuronales (Traub y Jefferys, 1994). Por lo anterior, la actividad GABAérgica resulta imprescindible en el control de la excitabilidad de esta estructura del cerebro. Esta propiedad electrofisiológica de excitabilidad/inhibición neural es identificable experimentalmente mediante el protocolo de estimulación por pulsos pareados.

## **Protocolo de pulsos pareados producidos por la exposición a la 7-O-GAC**

En condiciones control la estimulación por pulsos pareados en las colaterales de Shaffer, inducen la aparición de dos fEPSP en el área CA1, separados por un periodo corto (ms) entre ellos, genera una disminución sobresaliente en la amplitud del segundo fEPSP comparada con la amplitud del primer fEPSP; es decir, la relación aritmética de la amplitud del fEPSP 2 con respecto al fEPSP 1 ( $fEPSP\ 2 / fEPSP\ 1$ ) es menor a 1 en intervalos Inter-estímulos (IIE) entre 10 y 60 ms (García-Ugalde y cols., 1992; Casasola y cols., 2004); esta relación matemática se va perdiendo proporcionalmente cuando el IIE entre ambas respuestas se va haciendo más grande estableciendo con ello una regla simple: mientras menor sea la distancia entre los fEPSP existe una mayor inhibición, cuando el valor de esta relación es igual a 1, entonces ya no existe inhibición recurrente.

Figura 23



A la derecha, se muestran los fEPSP representativos durante la exposición a la 7-O-GAC (rombos verdes;  $n=3$ ) los cuales presentan un incremento en la inhibición recurrente (D-F;  $p \leq 0.02$ ) respecto a la inhibición GABAérgica control (A-C). En la gráfica se muestra la proporción matemática del protocolo por pulsos pareados a intervalos de 10-60 ms, en donde el cociente de la amplitud del segundo fEPSP entre la del primer fEPSP brinda una relación de inhibición (condiciones control círculos negros, grupo DMSO cuadros azules;  $n=3$ ) en comparación con un grupo expuesto a GABA (5mM, círculos blancos;  $n=3$ ).

Como se representa en la Figura 23, durante el registro de la relación de pulsos pareados (fEPSP 2/ fEPSP 1), en condiciones control se obtuvieron los siguientes cocientes:  $0.63 \pm 0.09$  a IIE de 10 ms (Figura 23A),  $0.76 \pm 0.04$  a IIE de 30 ms (Figura 23B) y de  $0.85 \pm 0.02$  a IIE de 60 ms ( $p \leq 0.005$ ) (Figura 23C), los cuales no fueron estadísticamente significativos respecto al grupo expuesto al DMSO (vehículo;  $p \leq 0.7$ ).

En contraste, para los grupos experimentales expuestos a la 7-O-GAC, la relación de las amplitudes del fEPSP 2 / fEPSP 1 a los 10, 30 y 60 ms fue de  $0.62 \pm 0.03$  (Figura 23 D),  $0.66 \pm 0.06$  (Figura 23E) y  $0.68 \pm 0.01$  (Figura 23F) respectivamente, todos ellos estadísticamente significativos respecto al grupo control ( $p \leq 0.02$ ). No obstante, la

inhibición por pulsos pareados que genera el GABA es semejante a la que evoca la 7-O-GAC, de tal forma que no se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.2$ ).

La inhibición recurrente que prueba la relación de los pulsos pareados se debe al siguiente mecanismo sináptico: en paralelo a la estimulación sináptica excitatoria, se estimula a una interneurona recurrente, cuya actividad es inhibitoria debido a la liberación de GABA; por lo que, en un periodo corto de estimulación, produce una mayor concentración del neurotransmisor GABA en el espacio sináptico, generando una paradoja fisiológica: una alta frecuencia de estimulación o periodos de estimulación cortos favorecen la disminución de la excitabilidad. Por lo que, la actividad de la interneurona en el hipocampo representa un sistema protector a las neuronas piramidales, impidiéndoles despolarizaciones por largos periodos.

Por lo anterior, el protocolo de pulsos pareados sirvió como un correlato electrofisiológico para evidenciar el incremento de la actividad GABAérgica producida por la 7-O-GAC el cual se observó previamente en la evolución temporal (Figura 21 y 22).

### **Relación de intensidad (estimulación) / voltaje (amplitud de la respuesta) durante la exposición de 7-O-GAC**

En condiciones control, la amplitud de una respuesta sináptica (fEPSP) depende de la intensidad, frecuencia y duración del estímulo, si estas dos últimas son constantes, entonces la amplitud del fEPSP depende de la intensidad del estímulo (umbral) que desencadena la actividad sináptica.

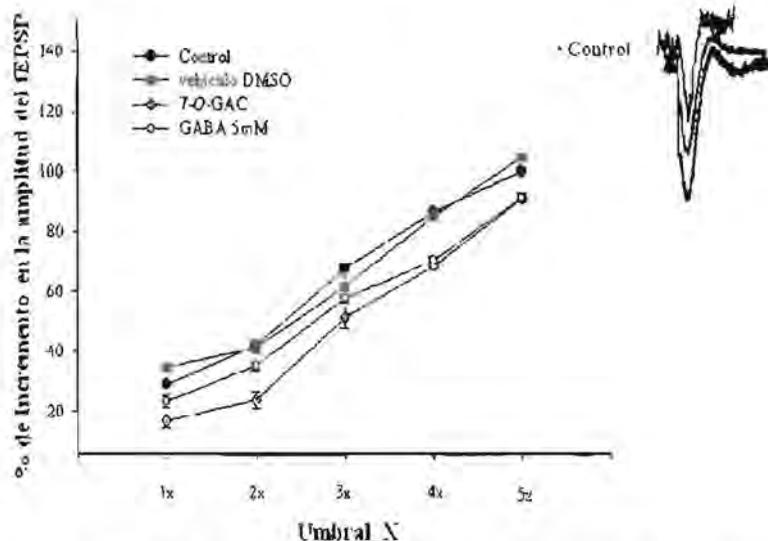
Como se representa en la Figura 1, en condiciones control no se generan modificaciones en la relación E/R en el tiempo de registro. Los fEPSPS fueron generados por el mismo rango de intensidad de estimulación (50-60% de la respuesta máxima),

semejante duración (0.4-1.0 ms) y frecuencia (0.1-0.2 Hz). La 7-O-GAC, incrementó la inhibición recurrente durante la estimulación de pulsos pareados, es decir, presentó una interacción positiva con la neurotransmisión GABAérgica. Por lo que, el siguiente protocolo fue encaminado a demostrar que en las rebanadas de hipocampo expuestas a 7-O-GAC la relación de E/R es menor; es decir, que la exposición a este glucósido flavonoide presenta un desplazamiento hacia la derecha. Una rebanada de hipocampo, en condiciones control, muestra una curva E/R que es proporcional al incremento de la amplitud del fEPSP (Figura 24, círculos negros), por lo que en este experimento, se normalizó la intensidad del estímulo a un valor inicial de umbral de inducción del fEPSP, por lo que el valor mínimo para generar la respuesta sináptica se definió como valor umbral (X).

La inhibición que presentaron las rebanadas expuestas a la 7-O-GAC, en la curva E/R muestra un desplazamiento a la derecha (Figura 24; rombos verdes). Este desplazamiento, indica que existe un menor número de neuronas sincronizadas en la respuesta inhibitoria.

Figura 24

Modificación de la relación amplitud fEPSP-intensidad de la estimulación en rebanadas expuestas a la 7-O-GAC



El incremento en la amplitud del fEPSP control (círculos negros; n=3) y DMSO (cuadros azules; n=3) guarda una proporcionalidad lineal del valor umbral (valores normalizados a la intensidad mínima para generar un fEPSP) hasta 5 veces este valor-umbral. En contraste, las rebanadas de hipocampo expuestas a 7-O-GAC (rombos verdes; n=3) y GABA (círculos blancos; n=3), muestran un corrimiento en la curva similar hacia la izquierda.

En resumen, la 7-O-GAC produjo un incremento en la actividad GABAérgica, tal como muestran los resultados de evolución temporal (Figura 21 y 22), comprobado en el protocolo de pulsos parados (Figura 23), al apreciarse un incremento en la inhibición

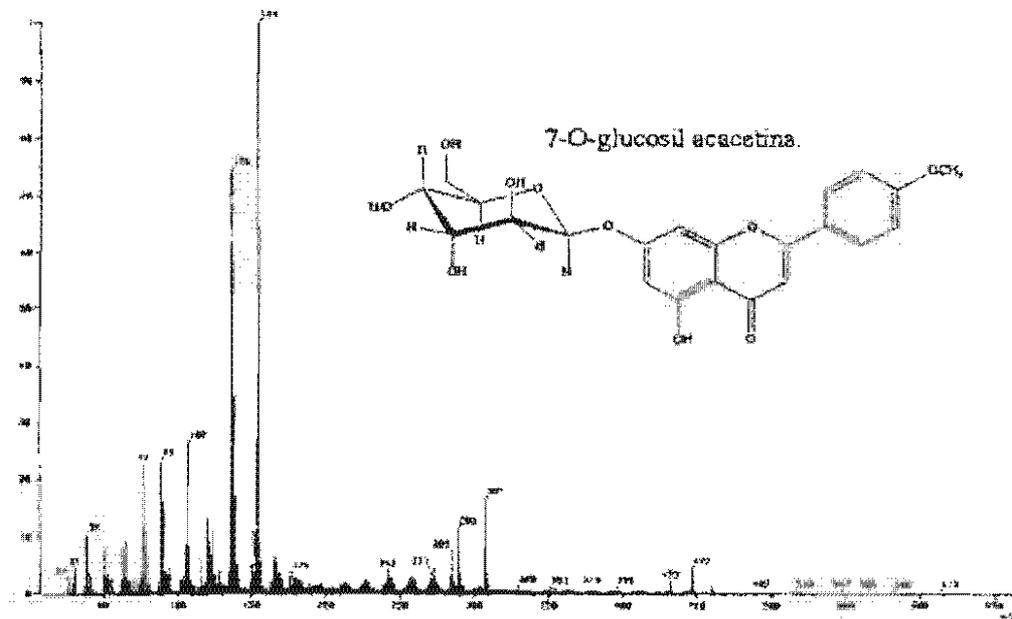
sináptica; así como se constató en la curva E/R. Este incremento en la actividad GABAérgica podría deberse al aumento de GABA en el espacio presináptico, o un incremento en la síntesis del neurotransmisor, o al cambio del receptor GABA<sub>A</sub>. Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para comprobar lo anterior.

## VIII. CONCLUSIONES

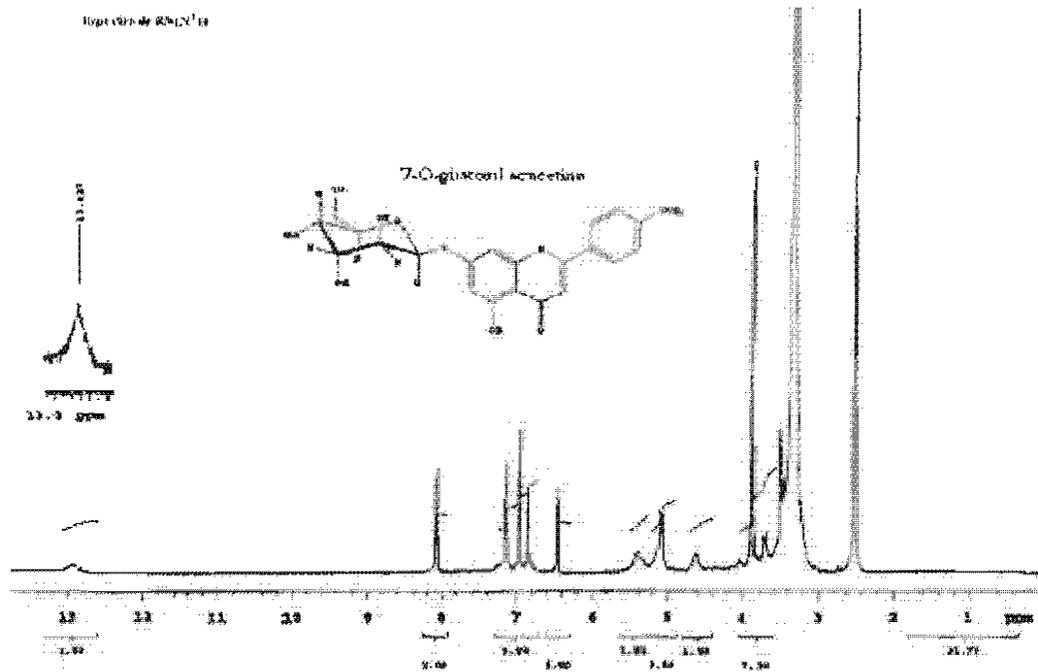
- *La 7-O-GAC* ejerció un efecto sedante en el modelo de tiempo de sueño inducido por Pb y en el modelo del tablero con perforaciones en ratones.
- *La 7-O-GAC* no produjo un efecto anticonvulsivo en el modelo de inducción química de convulsiones con PTZ.
- *La 7-O-GAC* evoca un efecto inhibitorio similar al ejercido por GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, en rebanadas de hipocampo de rata.
- *La 7-O-GAC* incremento la actividad inhibitoria de la en las rebanadas del hipocampo podría estar ligada a la síntesis o recaptura del GABA
- Es necesario realizar más estudios para determinar exactamente los mecanismos de acción de la *7-O-GAC*
- El presente trabajo es una aportación al estudio de búsqueda de moléculas bioactivas, a partir de fuentes vegetales.

Anexo I

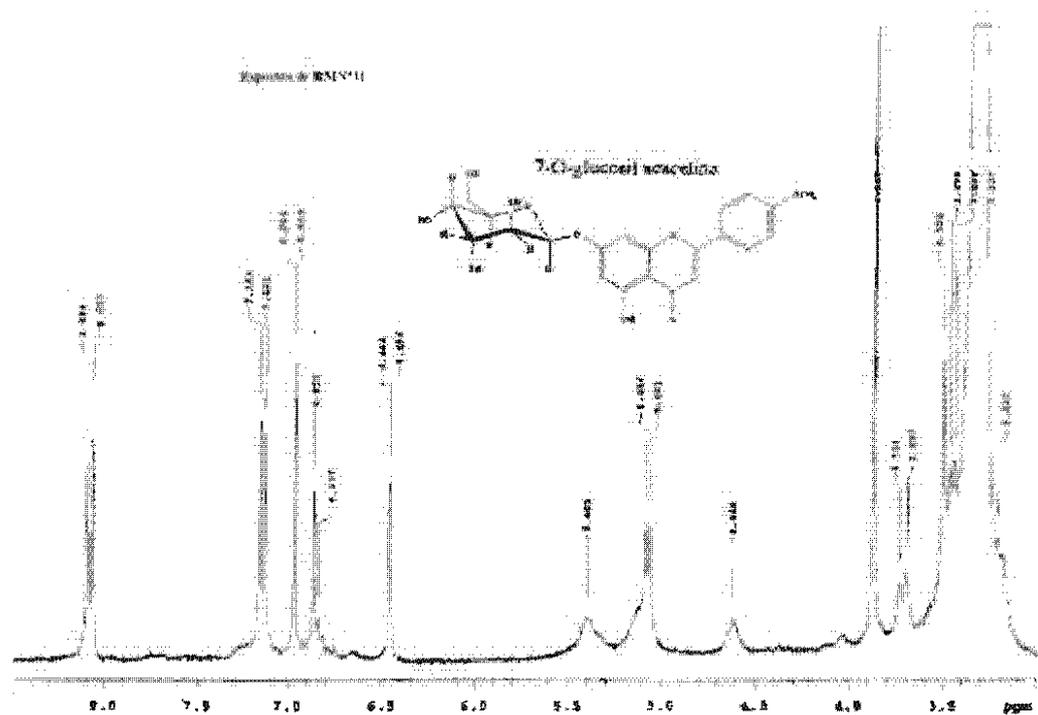
Espectro de masas: FAB<sup>+</sup>



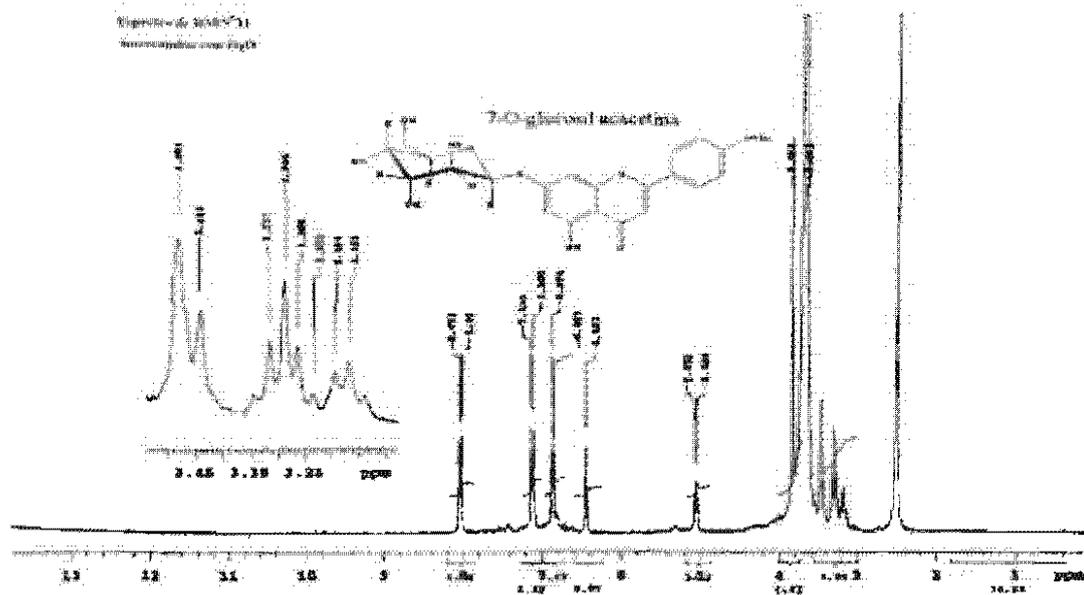
Anexo 1



Anexo 1



Annexo I



## VII. REFERENCIAS

- Akari, T. Kiyama, H. Tohyama, M. 1992b. Region specific expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  subunits mRNAs in the rat brain. *Mol Brain Res* 12: 293-314.
- Hollman, P.C.H y Katan, M.B. 1997. Absorption metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedical and Pharmacoterapeutics*; 51: 305-310.
- Diaz, R. Quevedo-Sarmiento 1988. Phytochemical and antibacterial screening of some species of Spanish Lamiaceae. *Fitoterapia* 59:329-332.
- Araki, T. Kiyama, H. Tohyama, M. 1992a. The GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 1$  subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Mol Brain Res* 15: 121-132.
- Avallone, R. Zanolì, P. Puia, G. Kleinschnitz, M. Baraldi, M. 2000. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria Chamomilla*. *Biochemical Pharmacology*. 59: 1387-1394.
- Avoli, M. Hwa, G. Louvel, I. Kurcewicz, R. Lacaille, J.C. 1997. Functional and pharmacological properties of GABA mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 526-534.
- Barberán, F. y Gil, M. 1990. Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae, R.M. Harley and T. Reynolds (ed.). *Advances in Labiatae Science*, London: Royal Botanic Gardens, Kew. págs. 299-305.
- Barberán, T. 1990 Labiateae flavonoids: chemical, chemotaxonomical, economical, and ecological aspects. *Revista Latinoamericana de Química*. 21: 134-139.
- Borman, J. 1988. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *TINS* 11: 112-116.
- Bovolín, P. Santi, M. Memo, M. Costa, E. Grayson, D 1992. Distinct developmental

patterns of expression of a rat  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\gamma 2s$  and  $\gamma 21$ ,  $\gamma$ -amino butyric acid-a receptor subunit mRNAs *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 59: 62-72.

Bowery, N. 1990. GABA transporter protein cloned from rat brain. *TIPS* 11: 435-437.

Bye, R.A. & Linares, E. 1983. The role of plants found in the Mexican market and their importance in ethnobotanical studies. *Journal of Ethnobiology*. 3, 1-13.

Chebib, M. Johnston, G. 1999. The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 937-940.

DeLorcy, T. Olsen, R. 1994. GABA and glycine. En: *Basic neurochemistry*: Siegel, G. Agranoff, B. Molinoff, B. Ed. Raven Press, New York, EUA.

Deutch, A. Roth, R. 1999. Neurotransmitters. En: *Fundamental Neuroscience*: Zigmond M. Bloom, F. Landis, S. Roberts, J. Squire, L. Ed. Raven Press, California, EUA.

Dewick, M. 1990. *Medicinal Natural Products*. Ed. John Wiley & Sons. Inc. 605 Third Avenue, New York. 10158-0012. EUA págs. 135-142

Díaz, R. y Quevedo-Sarmiento, J. 1988. Phytochemical and antibacterial screening of some species of Spanish Lamiaceae. *Fitoterapia* 59: 329-332.

Ebadi, M. 2002. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. CRC Press. 29 págs. 323-403.

Ernst, E. 2006. Herbal remedies for anxiety a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine* 13: 205-208.

Estrada, R. Aguirre, E. García, A. Soto, M. Linares, E. Bye, R. Heinze, G. Martínez, M. 2004. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp *mexicana* and *Agastache mexicana* subsp *xolocotziana*. *Biochemical systematics and ecology*.

32: 685-694.

Estrada-Reyes, R. Martínez-Vázquez, M. Gallegos-Solís, A. Heinze, G. and Moreno, J. Central Nervous System Depressant Effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae). Journal Ethnopharmacology 2009 en prensa.

Fernández, S. Wasowski, C. Paladini, C. Marder, M. 2003. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 77: 399-404.

Fernández, S. 2005. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. European Journal of Pharmacology 512: 189-198.

Fernández, S. Wasowski, P. Loscalzo, L. Grnger, R. Johnston, A. Paladini, A. Marder, M. 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. Eur. J. Pharmacol 539: 168-176.

Foster, A.C. Kemp, J. A. 2006. Glutamate and GABA based CNS therapeutics. Curr Opin Pharmacol 6: 7-17.

García-Ugalde, G. Brailowsky, S. 1993. Los receptores del GABA: de la electrofisiología a la biología molecular. Ciencia 44: 279-289.

Griez. 2001. Anxiety disorders. An Introduction to Clinical Management and Research. Jhon Wiley and Sons Ltd, UK.

Guastella, J. Nelson, N. Nelson, H. Czysyk, L. Keynen, S. Miedel, M. Davidson, N. Lester, H. Kanner, B. 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. Science 249: 1303-1306.

Hadingham, K. Harkness, P. McKernan, R. Quirk, K. Bourdelles, B. Home, A. Kemp, J. Bernard, A. Ragan, I. Whiting, P. 1992. Stable expression of mammalian type A  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in mouse cells: demonstration of functional assembly

of benzodiazepine-responsive sites. PNAS 89: 6378-6392.

Harbone 1989. Methods in plants biochemistry, Vol 1: Plant phenolics. Ed. J.B. Harbone. Academic Press, San Diego, CA, EUA

Havers, W. Luddens, H. 1998. The diversity of GABA<sub>A</sub> receptors. Mol Neurobiol 18: 35-86.

Heinze, G. 2003. La ansiedad: Como se concibe actualmente. Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. Vol.54, No. 2, págs. 8-15.

Houser, C. Vaughn, J. Hendry, S. Jones, E. Peters, A. 1984. GABA neurons in the cerebral cortex. Functional Properties of cortical cells. 2.

Kandel, E.R. Schwartz, J.H. Jessell, T.M. 2001. Principios de Neurociencia. ED. McGraw Hill Interamericana; 4<sup>ª</sup> Edición págs. 1220-1224.

Kandel, E.R. Schwartz, J.H. Jessell, T.M. 2001. Principios de Neurociencia. ED. McGraw Hill Interamericana; 4<sup>ª</sup> Edición págs. 1222-1224.

Kardos, J. 1999. Recent advances in GABA research. Neurochem Int 34: 353-358.

Karlsson, G. Pozza, M. Olpe, H. 1988. Phaclofen a GABA<sub>B</sub> blocker reduces long duration inhibition in the neocortex. Eur. J Pharmacol 148: 485-486.

Kaupmann, K. Huggel, K. Heid, J. Flor, J. Bishof, S. Mickel, S. McMaster, G. Angst, C. Bittiger, H. Froesti, W. Bettler, B. 1997. Expression cloning of GABA<sub>B</sub> receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature 386: 239-246.

Kerr, D. Ong, J. Prager, R. Gynther, B. Curtis, D. 1987. Phaclofen a peripheral and central baclofen antagonist. Brain Res 405: 150-154.

Kotsos, M. 1990. A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L: (Lamiaceae). Biochemical systematics and ecology 35: 381-385.

- Kotsos, M. 2007. A new flavonoid diglicoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (Lamiaceae). *Biochemical systematic and ecology* 35: 381-385.
- Krnjevic'K. 1984. Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account, En: *Functional properties of cortical cell*. Ed. Plenum, New York, EUA.
- Krnjevic'K. 1991. Significance of GABA in brain function. En: *GABA mechanism in epilepsy* Wiley-Liss, Inc. USA
- Krnjevic'K. 1997. Role of GABA in cerebral cortex. *Can J. Physiol Pharmacol* 75: 439-451.
- Kuffler, S. Nichols, J. Marin, A. 1984. *From neuron of the brain*. Massachusetts.
- Kuriyama, K. Hirouchi, M. Nakayasu, H. 1993. Structure and function of cerebral GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *Neurosci Res* 17: 91-99.
- Kurt, H. y Andrew, M. 2002. Twenty years of research into medicinal plants: Result and perspectives. *Phytochemistry Reviews*. 1: 275-285.
- Li, J. y Ding, Y. 2001. Studies on chemical constituents from *Dracocephalum moldavica* L. *Journal of Chinese Material Medica* 26: 697-8 [Solo se tuvo acceso al resumen].
- Linares, M.E. Flores, B. Bye, R. 1997. *Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales*. Instituto de Biología, UNAM, versión de CD-ROM, sin núm. de página.
- Liu, Q. Mandiyan, S. Nelson, H. Nelson, N. 1992. A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *PNAS* 89:6639-6643.
- Luddens, H. Korpi, R. Seeburg, H. 1995. GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiologic implications. *Neuropharmacol* 34: 245-254.

Marder, M. Viola, H. Wasowski, C. Fernández, S. Medina, J. Paladini, A. 2003. 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol. Biochem Behav.* 75: 537-545.

McDonald, R. Olsen, R. 1994. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 17: 569-602.

McKernan, R. Whiting, P. 1996. Which GABA<sub>A</sub> receptors subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143.

Mehta, A. Ticku, M. 1999. An update on GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Res Rev* 29: 196-217.

Middleton, E. Kandaswami, C. Theoharides, T. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52:673-751.

Mohler, H. 2006. GABA<sub>A</sub> receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 731-740.

Nelson, H. Mandiyan, S. Nelson, N. 1990. Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS* 269:181-184.

Nurse, S. Lacaille, J. 1997. Do GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> inhibitory postsynaptic response originate from distinct interneurons in the hippocampus?. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 520-525.

Ohmori, Y. Kuriyama, k. 1991. Pharmacological and biochemical characteristics of partially purified GABA<sub>B</sub> receptor. *Neurochem Res* 16: 357-362.

Olsen, R. Tobin, A. 1990. Molecular Biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEBJ* 4: 1469-1480.

- Panthong, A. 2007. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangulais* Linn. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 264-270.
- Paul, S. GABA and glycine. En: *Neuropharmacology: the fourth generation of progress*. Bloom, F. Kupfer, J. Ed. Raven Press, New York, EUA.
- Pérez de la Mora, M. 2003. Dónde y cómo se produce la ansiedad: Sus bases biológicas. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. Vol. 54, No. 2, págs 16-28.
- Rodríguez-Hahn, L. Cárdenas, J. 1999. Comparative chemotaxonomy in Labiatae. *Current topics in Phytochemistry*. 2.
- Sanders, R. 1987. Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae-Nepeteae). *Syst. Bot. Monogr.* 15: 1-92.
- Sieghart, W. Fuchs, K. Treter, V. Ebert, V. Jechlinger, M. Hoyer, H. Adamiker, D. 1999. Structure and subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurochem Int* 34: 379-385.
- Soltész, I. Haby, M. Leresche, N. Crunelli, V. 1988. The GABA<sub>B</sub> antagonist phaclofen inhibits the late K<sup>+</sup> dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. *Brain Res* 448:351-354.
- Tapia, R. Sandoval, M. Contreras, P. 1975. Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J Neurochem* 12: 1283-1285.
- Thompson, C. Bodewits, G. Stephenson, A. Turner, J. 1992. Mapping of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  subunit like immunoreactivity in rat brain. *Neurosci Letters* 144: 53-56.

Viola, H. Wasowski, C. Levi de Stein, M. Wolfman, C. Silveira, R. Dajas, F. Medina, J. H. and Paladini, A.C. 1995. Apigenin, a component of *Matricaria reticulata* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligan with anxiolytic effects. *Planta Medica*. 21, 213-216.

Wafford, K. Brain, C. Quirk, K. McKernan, R. Wingrove, P. Whiting, P. Kemp, J. 1994. A novel allosteric modulatory site on the GABA<sub>A</sub> receptor beta subunit. *Neuron* 12: 775-782.

Wang, F. Yan Huen, M.S. Ying Tsang, S. Hong Xue. 2005. Neuroactive Flavonoids Interacting with GABA<sub>A</sub> receptor complex. *Current Drug Target-CNS & Neurological Disorders*. 4: 575-585.

Wang, J. Kofuji, P. Burt, D. 1992. Strain comparisons and developmental profile of the delta subunit of the murine GABA<sub>A</sub> receptor. *Brain Res Bull* 29: 119-123.

Wilcox, A. Warrington, J. Gardiner, K. Berger, R. Whiting, P. Altherr, M. Wasmuth, J. Patterson, D. Sikela, J. 1992. Haman chromosomal localization of genes encoding the  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$  subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *PNAS* 89: 5857-5861.

Wolfman, C. Viola, H. Marder, M. Ardenghi, P. Wasowski, C, Schröder, N. Izquierdo I. Rúveda, E. Paladini, A. y Medina, H. 1998. Pharmacological characterization of 6-Bromo-3'-nitroflavone, a Synthetic Flavonoid with high Affinity for the Benzodiazepine Receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61: 239-246.

Wu, J. Chang, Y. Li, G. Xue, F. Dechon, J. Elisworth, K. Liu, O. Yang, K. Bahadroani, N. Zheng, C. Zhang, J. Rekate, H. Rho, J.M. Kerrigan, J.F. 2007. Electrofisiological properties and subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptors in

patients with gelastic seizures and hypothalamic hamartoma. *J Neurophysiol* 98: 5-15.

Zhang, J. Sato, M. Tohyama, M. 1992. Co expression of the  $\beta 2$  subunit genes of the

GABA<sub>A</sub> receptor in the magnocellular preoptic nucleus. *Mol Brain Res* 15: 171-173.