



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“EFECTOS ANSIOLÍTICOS DE LA ANNOMONTINA Y LA LIRIODENINA,  
ALCALOIDES AISLADOS DEL GENERO *Annona*”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**JOSÉ DEL CARMEN REJÓN ORANTES**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA  
COTUTOR DE TESIS: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA  
COMITÉ TUTOR: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011



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.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“EFECTOS ANSIOLÍTICOS DE LA ANNOMONTINA Y LA LIRIODENINA,  
ALCALOIDES AISLADOS DEL GENERO *Annona*”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**JOSÉ DEL CARMEN REJÓN ORANTES**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA  
COTUTOR DE TESIS: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA  
COMITÉ TUTOR: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **REJON ORANTES JOSE DEL CARMEN** con número de cuenta **506011395** con la tesis titulada: "**Efectos ansiolíticos de la Annomontina y la Liriodenina, alcaloides aislados del género *Annona***", realizada bajo la dirección de la **DRA. ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA**:

Presidente:	DR. MIGUEL PEREZ DE LA MORA
Vocal:	DR. MARIANO MARTINEZ VAZQUEZ
Secretario:	DR. ALFONSO EFRAIN CAMPOS SEPULVEDA
Suplente:	DRA. CAROLINA LOPEZ RUVALCABA
Suplente	DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN

De acuerdo con lo anterior, el alumno se acogió a la nueva normatividad, para la integración de su jurado con cinco sinodales, con base en el artículo **QUINTO TRANSITORIO**, en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

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

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 12 de agosto de 2011.

  
**Dra. Maria del Coro Arizmendi Arriaga**  
**Coordinadora del Programa**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al Programa de **Posgrado en Ciencias Biológicas**, UNAM. Por su valioso apoyo que me permitio avanzar en mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**). Por la beca recibida.

A los miembros de mi comité tutor:

**DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA**

**DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA**

**DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN**

## **Agradecimientos a título personal**

A la DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA, por haberse arriesgado al recibirme como alumno.

Al DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA, por confiar en mí, enseñarme a ser objetivo y tenerme una infinita paciencia.

Al DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN, por contagiarme de su entusiasmo y optimismo para abordar los desafíos del posgrado.

A los miembros del jurado de mi examen de candidatura; DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES, DRA. ANA MARIA LÓPEZ COLOME, DRA. GINA LORENA QUIRARTE y DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN por ubicarme frente a mis numerosas deficiencias y permitirme luchar por superarlas.

A los miembros del jurado de mi examen de titulación: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA, DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ, DRA. CAROLINA LÓPEZ RUBALCAVA, DR. EFRAÍN ALFONSO CAMPOS SEPULVEDA y DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN por sus importantes comentarios que permitieron enriquecer mi trabajo de tesis.

A todos los integrantes del laboratorio del DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde recibí todo el tiempo apoyo, afecto, orientación y facilidades para trabajar muy a gusto, en especial a la QFB. MINERVA CRESPO RAMIREZ por todo su apoyo y asesoría técnica.

Al QFB. ARTURO PIÑA CAMARA, por sus palabras de motivación para que continúe en la búsqueda de la excelencia académica.

A la M. en C. ANA MARÍA ESCALANTE GONZALBO de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México por todo su apoyo.

A la BIOL. ROCÍO GONZÁLEZ ACOSTA de la oficina de Posgrado del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, por auxiliarme y asesorarme con gusto en los numerosos tramites burocráticos del posgrado.

A la CP. MARÍA DE JESÚS MÁRQUEZ SALAZAR de apoyos económicos del Posgrado en Ciencias Biológicas, por estar siempre en la mejor disposición.

## ÍNDICE GENERAL

<i>Resumen</i> .....	1
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Introducción</i> .....	5
<i>Objetivos</i> .....	6
1. ANTECEDENTES .....	7
1.1 Generalidades de alcaloides de Annonaceae.....	7
1.2 Alcaloides de <i>Annona purpurea</i> .....	8
1.2.1 Annomontina.....	9
1.2.2 Liriodenina.....	10
1.2.2.1 Actividades farmacológicas.....	11
1.2.2.2 Actividad antimicrobiana.....	11
1.2.2.3 Actividad anticancerígena.....	11
1.2.2.4 Efectos cardiovasculares.....	12
1.2.2.5 Efectos sobre algunos receptores.....	12
1.3 Descripción botánica de las especies estudiadas.....	13
1.4 Modelos conductuales para el estudio de la ansiedad.....	14
1.4.1. Modelos conductuales condicionados.....	16
1.4.2. Modelos conductuales no condicionados.....	16
1.4.2.1 Prueba de campo abierto.....	17
1.4.2.2 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”.....	17
1.4.2.3 Prueba de la caja luz/oscuridad.....	18
1.4.2.4 Prueba de enterramiento de canicas.....	18
1.4.2.5 Prueba de la plataforma con orificios.....	18
1.4.2.6 ¿Cómo escoger el modelo adecuado?.....	19
1.4.2.7 Pruebas para el estudio de actividad dopaminérgica.....	19
1.4.2.7.1 De la barra.....	19
1.4.2.7.2 Hiperactividad inducida por anfetamina.....	21
1.5 Receptores.....	21
1.5.1 Receptores GABAérgicos.....	21
1.5.1.1 Receptores GABA <sub>A</sub> .....	22
1.5.1.1.1 Estructura.....	22



1.5.1.1.2 Función y farmacología.....	22
1.5.1.2 Receptores GABA <sub>C</sub> .....	23
1.5.1.3 Receptores GABA <sub>B</sub> .....	24
1.5.1.4 Síntesis.....	25
1.5.1.5 Biotransformación.....	25
1.5.2 Receptores dopaminérgicos.....	25
1.5.2.1 Dopamina.....	25
1.5.2.2 Clasificación.....	26
1.5.2.3 Síntesis.....	28
1.5.2.4 Biotransformación.....	29
1.6 Extractos y alcaloides de <i>Annona</i> con actividad en receptores GABAérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, adrenérgicos y otros.....	29
1.6.1 Efectos GABAérgicos.....	30
1.6.2 Efectos serotoninérgicos.....	30
1.6.3 Efectos dopaminérgicos.....	32
1.6.4 Efectos adrenérgicos.....	33
1.6.5 Efectos sobre otros receptores.....	34
2. METODOLOGIA.....	35
2.1 Diagrama general del método.....	35
2.2 Material.....	35
2.3 Extracción y aislamiento del extracto alcaloidal total.....	35
2.4 Purificación e identificación de annomontina.....	36
2.5 Extracto hexánico.....	36
2.6 Extracción y aislamiento de la liriodenina.....	37
2.7 Purificación e identificación de la liriodenina.....	38
2.8 Animales.....	38
2.9 Evaluación conductual.....	38
2.10 Fármacos.....	38
2.11 Evaluación de la ansiedad.....	39
2.11.1 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”.....	39
2.11.2 Prueba de la caja luz/oscuridad.....	39
2.11.3 Prueba de enterramiento de canicas.....	40
2.11.4 Prueba de la plataforma con orificios.....	40
2.12 Evaluación de la integridad locomotriz.....	41

2.12.1 Prueba de campo abierto.....	41
2.12.2 Prueba del rodillo rodante.....	41
2.13 Evaluación de la sedación.....	42
2.13.1 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital.....	42
2.14 Evaluación de la actividad dopaminérgica.....	43
2.14.1 Prueba de la barra.....	43
2.14.2 Prueba de la hiperactividad inducida por anfetamina.....	43
2.15 Toxicidad.....	44
2.16 Análisis estadísticos.....	44
3. RESULTADOS.....	45
3.1 Efectos conductuales de los extractos alcaloidal total y hexánico obtenidos de la raíz de la <i>Annona purpurea</i> MOC. & SESSE.....	45
3.1.1 Extracto alcaloidal total.....	45
3.1.1.1 Toxicidad.....	45
3.1.1.2 Prueba de campo abierto.....	45
3.1.1.3 Prueba del rodillo rodante.....	45
3.1.1.4 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital.....	46
3.1.1.5 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”.....	46
3.1.2 Extracto hexánico.....	46
3.1.2.1 Toxicidad.....	46
3.1.2.2 Prueba de campo abierto.....	47
3.1.2.3 Prueba del rodillo rodante.....	48
3.1.2.4 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital.....	48
3.1.2.5 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”.....	49
3.2 Efectos conductuales de la annomontina.....	49
3.2.1 Toxicidad.....	49
3.2.2 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”.....	49
3.2.3 Prueba de campo abierto.....	51
3.2.4 Prueba del rodillo rodante.....	52
3.2.5 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital.....	52
3.3 Efectos conductuales de la liriodenina.....	53
3.3.1 Toxicidad.....	53
3.3.2 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”.....	53
3.3.3 Prueba de la caja luz/oscuridad.....	53

3.3.4 Prueba de enterramiento de canicas.....	54
3.3.5 Prueba de la plataforma con orificios.....	55
3.3.6 Prueba de campo abierto.....	55
3.3.7 Prueba del rodillo rodante.....	56
3.3.8 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital.....	57
3.3.9 Prueba de la barra.....	57
3.3.10 Prueba de hiperactividad inducida por anfetamina.....	58
4. DISCUSIÓN.....	59
5. CONCLUSIONES.....	65
6. LITERATURA CITADA.....	66

## ABREVIATURAS

5HT: Serotonina  
8-OH-DPAT: 8-hidroxi-dipropilaminotetralina  
AC: Adenil ciclasa  
AMPH: Anfetamina  
BIQ: Bencilisoquinolinicos  
BZD: Benzodiazepinas  
Ca<sup>+2</sup>: Calcio  
CCK: Colecistoquinina  
CFU: Unidades formadoras de colonias  
Cl<sup>-</sup>: Cloro  
COMT: Catecol-o-metiltransferasa  
DA: Dopamina  
DAA: Descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos  
DAT: Transportador de dopamina  
DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético  
EAT: Extracto alcaloidal total  
EH: Extracto hexánico  
GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia  
HT: Hidroxilasa de tirosina  
HVA: Ácido homovanílico  
i.p.: Intraperitoneal  
K<sup>+</sup>: Potasio  
L-DOPA: Dihidroxifenilalanina  
LEFM: Laberinto elevado en forma de “+”  
MAO: Monoaminooxidasa  
MS: Metabolitos secundarios  
NA: Noradrenalina  
Na<sup>+</sup>: Sodio  
NCA: Núcleo central de la amígdala  
ON: Oxido nítrico  
OXA: Oxoaporfínico  
PTZ: Pentilinetetrazol  
P $\beta$ C: Pirimidil- $\beta$ -carbolina  
SNC: Sistema Nervioso Central

## Resumen

Los extractos y alcaloides del género *Annona* se caracterizan por poseer efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), sin embargo los informes acerca de los efectos de los alcaloides de la *Annona purpurea* y *A. diversifolia* son escasos. En el presente trabajo se dan a conocer los efectos sobre el SNC de extractos crudos de *A. purpurea* así como de la annomontina, un alcaloide pirimidil- $\beta$ -carbolina que no había sido informado previamente en la *A. purpurea* y la liriodenina, un alcaloide oxoaporfínico perteneciente al grupo de los bencilisoquinolinicos obtenido de la *A. diversifolia*.

Los efectos de extractos de la *A. purpurea* en pruebas conductuales no están reportados. En esta investigación encontramos que el extracto alcaloidal mostró propiedad sedante en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital y careció de toxicidad a las dosis probadas, evaluada por el número de ratones muertos en 48 h. El extracto hexánico disminuyó la actividad motora espontánea en la prueba de campo abierto, afectó la coordinación motriz en el rodillo rodante y prolongó el tiempo de hipnosis por pentobarbital, indicando poseer un efecto depresor del SNC. La actividad farmacológica de la annomontina está escasamente documentada, se sabe que posee una modesta actividad analgésica y antiinflamatoria, un efecto antileishmaniasico, así como estimulación del receptor de dioxina. Otros alcaloides derivados de la  $\beta$ -carbolina actúan en la unión de las benzodiazepinas al receptor GABA<sub>A</sub> y poseen actividad ansiolítica. En este trabajo se investigaron los efectos ansiolíticos de la annomontina, usando la prueba del laberinto elevado en forma de "+". Asimismo, fueron también evaluados los efectos conductuales de este alcaloide en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital, la actividad locomotriz y la coordinación motora. En el laberinto elevado en forma de "+", la inyección intraperitoneal de annomontina, incrementó en forma dosis-dependiente tanto la entrada de los animales a los brazos abiertos del laberinto como el tiempo de permanencia en ellos. Dichos efectos fueron bloqueados por la administración previa de flumazenil un antagonista específico de la unión de las benzodiazepinas al receptor GABA<sub>A</sub>. En contraste, la annomontina inyectada por la misma vía y a las mismas dosis no tuvo ningún efecto en la conducta de los animales en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital, ni afectó la actividad locomotriz y/o la coordinación motora. Los resultados anteriores sugieren que la annomontina posee efectos ansiolíticos y que probablemente dichos efectos estén mediados a nivel del sitio de unión de las benzodiazepinas en el receptor GABA<sub>A</sub>.

Dado que se han demostrado actividades ansiolíticas en los alcaloides bencilisoquinolinicos y que en experimentos *in vitro*, la liriodenina afecta los sistemas catecolaminérgicos al inhibir las actividades de las enzimas hidroxilasa de la tirosina y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, y disminuye la liberación de dopamina en células PC12 se consideró importante estudiar los efectos de este alcaloide en algunas conductas donde los sistemas catecolaminérgicos están involucrados. Los resultados mostraron que la administración sistémica de liriodenina en ratones tiene efectos significativos sobre la ansiedad, evaluados en la prueba no condicionada de enterramiento de canicas. Sin embargo, este compuesto careció de efectos en las pruebas de

caja luz/oscuridad, plataforma con orificios y laberinto elevado en forma de "+". Por otro lado, este compuesto produce sedación, prolongación de la hipnosis inducida por pentobarbital y un efecto cataleptogénico claro, pero de poca duración, medido en la prueba de la barra. De la misma manera, la liriodenina produjo una disminución de la hiperactividad motora inducida por anfetamina, así como una pérdida de la coordinación motriz en la prueba del rodillo rodante. Finalmente se encontró una disminución de la actividad motora espontánea en la prueba de campo abierto. Los resultados anteriores sugieren que la liriodenina podría ejercer parte de sus efectos conductuales interfiriendo con la transmisión dopaminérgica.

## **Abstract**

Extracts and alkaloids of the genus *Annona* are characterized by having activity on the central nervous system (CNS), however the reports dealing with the effects of alkaloids from *Annona purpurea* and *A. diversifolia* are scarce. The present study informs about the effects on the CNS of crude extracts from *A. purpurea* as well as of the annomontine, a pyrimidyl- $\beta$ -carboline alkaloid which had not been informed before in *A. purpurea*, and liriodenine, an oxoaporphinic alkaloid belonging to the group the benzyloquinolines isolated from *A. diversifolia*.

The effects of extracts from *A. purpurea* in behavioral tests have not been reported. In this investigation we found that the alkaloidal extract showed sedative properties in the pentobarbital-induced hypnosis test without toxicity at the doses tested assessed by the number of dead mice within 48h. The hexane extract decreased spontaneous motor activity in the open field test, affected motor coordination in the rotarod test and prolonged pentobarbital sleeping time, indicating a depressant action on the CNS. The pharmacological activity of annomontine is poorly documented, however it is known that it possesses a modest analgesic, anti-inflammatory, an antileishmanial effect, and stimulation on the dioxin receptor. Other alkaloids derived from  $\beta$ -carboline acting at benzodiazepine binding and GABA<sub>A</sub> receptor has anxiolytic activity. In this work we investigated the anxiolytic effects of annomontine, using the elevated plus maze test. The behavioral effects of this alkaloid in the pentobarbital-induced hypnosis test, locomotor activity and motor coordination were also evaluated. In the elevated plus maze the intraperitoneal injection of annomontine, increased in a dose dependent fashion both, the entry of animals into the open arms of the maze and time spent on them. These effects were blocked by prior administration of flumazenil, a specific antagonist of benzodiazepine binding site of GABA<sub>A</sub> receptor. In contrast, annomontine injected by the same route and in the same dose had no behavioral effect in the hypnosis induced by pentobarbital, nor affected locomotor activity and / or motor coordination. The above results suggest that annomontine has anxiolytic effects and that these effects are probably mediated at the binding site for benzodiazepines in GABA<sub>A</sub> receptor.

As we have demonstrated anxiolytic activity in the alkaloids benzyloquinolines and using in vitro experiments, liriodenine affects catecholaminergic systems by inhibiting the enzyme activities of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase and also decreases the release of dopamine in cells PC12, it was considered important to study the effects of this alkaloid in some behaviors where the catecholaminergic systems are involved. The results showed that systemic administration of liriodenine in mice has significant anxiolytic effects as evaluated in the marbles-burying non conditioned test. However, this compound had no effect on light / dark box test, the hole board and in the elevated plus maze. On the other hand, this compound produces sedation, increases hypnosis induced by pentobarbital and a clear, but short-term, cataleptic effect measured in the test of the bar. Similarly, the liriodenine decreases the amphetamine-induced motor hyperactivity and a loss of motor coordination in the rotarod test. Finally we

found a decrease in spontaneous motor activity in open field test. The above results suggest that liriodenine could exert some of their behavioral effects by interfering with dopaminergic neurotransmission.

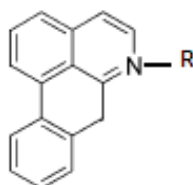


## Introducción

La familia Annonaceae está integrada por especies de árboles, arbustos y enredaderas que forman parte del complejo Ranaleano que agrupa las plantas más primitivas de las dicotiledóneas. La familia se distribuye en los trópicos de todo el mundo y se estima que tiene alrededor de 2000 especies incluidas en 120 géneros.

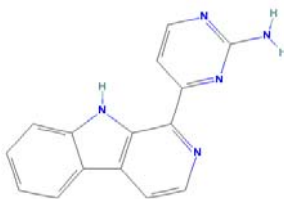
La fitoquímica de esta familia está constantemente sujeta a revisiones [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a,b</sup>; Cave, *et al.*, 1997; Bermejo *et al.*, 2005] y tanto la diversidad biogenética como estructural de los metabolitos secundarios (MS) que en ella se encuentran demuestran su potencial como recurso de nuevos compuestos.

Uno de los grupos de MS que caracteriza a las familias del Complejo Ranaleano son los alcaloides derivados de los aminoácidos tirosina y triptófano, de modo que en la familia Annonaceae se encuentran alcaloides con estructuras variadas que experimentan con frecuencia una dinámica biosintética activa [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a,b</sup>; Liscombe & Facchini, 2008]. Los alcaloides identificados en el género *Annona* corresponden a los bencilisoquinolínicos (BIQ) y en menor proporción a los del tipo pirimidil- $\beta$ -carbolina (P $\beta$ C). Los primeros, son un grupo de alcaloides caracterizados por la presencia de un anillo isoquinolínico y otro bencílico (Figura 1), son los más frecuentemente aislados y de quince especies se han obtenido cuando menos ochenta alcaloides distintos [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a,b</sup>; Guinaudeau *et al.*, 1988, 1994; Kenneth, 1999; Chang *et al.*, 2000].



**Figura 1.** Los alcaloides bencilisoquinolínicos tienen en común el esqueleto aporfínico, estructurado por un anillo isoquinolínico y otro bencílico [Guinaudeau *et al.*, 1975].

Los alcaloides del tipo P $\beta$ C, están estructuralmente constituidos por la 2-aminopirimidina unida a una mitad hartman ( $\beta$ -carbolina) (Figura 2) y contrariamente a lo que pasa con los alcaloides BIQ, los pertenecientes a este grupo son una clase de compuestos de difícil aislamiento, razón por la cual solo se conocen tres miembros [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a</sup>; Costa *et al.*, 2006, 2008].



**Figura 2. Los alcaloides pirimidil- $\beta$ -carbolinaestán estructuralmente constituidos por la 2-aminopirimidina unida a una  $\beta$ -carbolina [Costa et al., 2008].**

Con la evidencia de que existen alcaloides bioactivos contenidos en estas plantas y el hecho de que compuestos de otras anonas poseen efectos farmacológicos en el SNC, consideramos importante estudiar a una de las especies más abundantes en Chiapas: la *A. purpurea*. Para ello se aislaron los alcaloides annomontina y liriodenina a partir de los extractos alcaloidales de *A. purpurea* y se determinó la actividad ansiolítica de ambos por medio de pruebas conductuales. Sin embargo, dado el bajo contenido de liriodenina en el extracto alcaloidal de *A. purpurea*, la liriodenina usada en este trabajo se obtuvo de la *A. diversifolia* donde el alcaloide tiene una mayor concentración.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el potencial ansiolítico de la annomontina y la liriodenina alcaloides del género *Annona*.

### **Objetivos particulares**

Determinar mediante modelos de ansiedad el potencial ansiolítico de los extractos hexánico y alcaloidal.

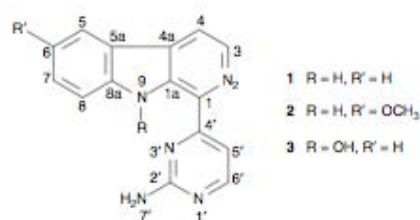
Aislar y evaluar aquellos alcaloides que se encuentren con más abundancia en los extractos alcaloidales de la raíz de la *Annona purpurea*.

Determinar mediante modelos animales de ansiedad sus propiedades ansiolíticas esenciales.

Determinar la especificidad conductual de sus efectos.

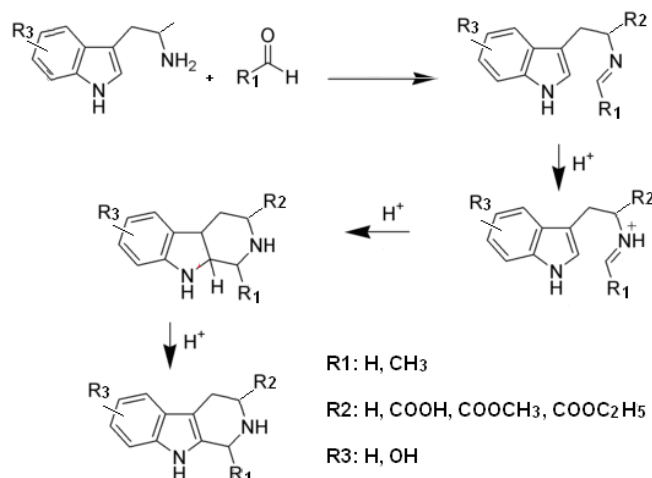


difícil aislamiento y solo se conocen tres miembros (Figura 4) [Leboeuf, 1982<sup>a</sup>; Costa *et al.*, 2006, 2008].



**Figura 4. Representación estructural de las tres pirimidil-β-carbolinas conocidas hasta ahora: la annomontina (1), la metoxiannomontina (2) y la N-hidroxiannomontina (3) [Costa *et al.*, 2008].**

La reacción de condensación de Pictet-Spengleren donde las indoletilaminas o el triptófano reaccionan con un aldehído o un α-cetoácido, parecería ser la ruta más eficiente para la síntesis química de las tetrahydro-β-carbolinas del tipo del ácido tetrahydro-β-carbolina-3-carboxílico (Figura 5) [Cao *et al.*, 2007].



**Figura 5. Condensación de Pictet-Spengler para la síntesis de β-carbolinas [Cao *et al.*, 2007].**

## 1.2 Alcaloides de *Annona purpurea*

No se han documentado estudios sobre los efectos en el SNC de extractos de la *Annona purpurea*, sin embargo, se han encontrado más de 34 alcaloides, algunos de ellos con diferentes actividades biológicas en receptores del SNC y periféricos (Cuadro 1); se encuentran en la raíz, el tallo y las hojas de este árbol. De entre ellos destacan la oxonuciferina, la predicentrina, la glaucina, la N-metilasimilobina, la N-metillaurotetanina, la glaziovina, la talbaicalidina, la N-formil-purpureina, la talicpureina, la dehidrolirinidina, la 7-hidroxi-dehidroglaucina, la 7-hidroxi-dehidrotalicsimidina y la 7-formil-dehidrotalicsimidina que se han extraído de sus hojas [Chang *et al.*, 1998<sup>a,b</sup>]. De su tallo se han obtenido la liriodenina, isocorydina, la promucosina, la

romucosina F, la romucosina G, la estefarina, la norglaucina, la nortalbaicalidina, la purpureina, la apoglaziovina, la pallidina, la norpallidina, la o-metilflavinantina, la reticulina y la talifolina [Chang *et al.*, 2000] y tanto de sus hojas como de su tallo: la norpurpureina, la talicsimidina, la oxopurpureina, la oxoglaucina, la lysicamina y la lirinidina [Chang *et al.*, 1998<sup>a,b</sup>, 2000].

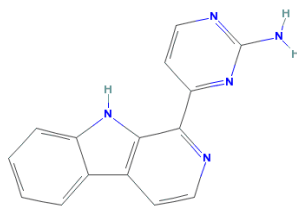
**Cuadro 1. Actividad sobre receptores de alcaloides presentes en *Annona purpurea*.**

Alcaloides	Dopaminérgicos	Serotonérgicos	Adrenérgicos	Muscarínicos	GABAérgicos
Glaucina	Antagonista D2		Antagonista Alfa 1		
Isocoridina			Antagonista Alfa 1		
Liriodenina	Inhibición enzimática		Antagonista Alfa 1	Antagonista M3	
Predicentrina	Antagonista D1		Antagonista Alfa 1		
Reticulina	Neuro-toxicidad		<Ca	Antagonista M	Neuro-toxicidad
Lirinidina		Antagonista 5-HT			

### 1.2.1 Annomontina

La annomontina es un alcaloide P $\beta$ C (Figura 6) que no se había aislado de la *Annona purpurea*. Los alcaloides P $\beta$ C son muy interesantes desde el punto de vista estructural, pues están constituidos por la 2-aminopirimidina unida a una  $\beta$ -carbolina. Son una clase de compuestos de los cuales solo se conocen tres miembros; la annomontina, la metoxi-annomontina y la *N*-hidroxi-annomontina (Figura 4). La annomontina y la metoxi-annomontina fueron aislados por primera vez de *Annona montana* Macf. [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a</sup>]. Posteriormente ambos fueron obtenidos de la *A. reticulata* [Yang & Cheng, 1987 citado por Costa *et al.*, 2008] y la annomontina también se obtiene por síntesis química [Bracher & Hildebrand, 1993 citado por Costa *et al.*, 2008]. La *N*-hidroxi-annomontina fue aislada de *Annona foetida* Martius [Costa *et al.*, 2006, 2008].

Los efectos biológicos de este tipo de alcaloides están poco documentados pues al parecer la dificultad de su aislamiento no ha favorecido su estudio. De la annomontina, se sabe que posee una modesta actividad analgésica y antiinflamatoria en ratones a dosis de 100 mg/kg administrada por vía oral [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a</sup>]. El alcaloide posee además un efecto antileishmaniasico, exhibido *in vitro* contra formas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* a una IC<sub>50</sub> de 34.8  $\mu$ M [Costa *et al.*, 2006], así como estimulación del receptor de dioxina en células humanas de hígado y piel en cultivo [Haarmann-Stemmann *et al.*, 2010].



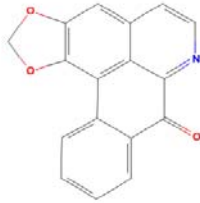
**Figura 6. Estructura química de la anomontina. Como puede observarse el alcaloide está constituido por la unión de la 2-aminopirimidina unida a una mitad hartman [Leboeuf et al., 1982<sup>a</sup>].**

A diferencia de la anomontina, otros alcaloides tipo  $\beta$ -carbolina han sido mejor estudiados. Dichos alcaloides se han aislado de plantas [Jaspers et al., 1986; Tse et al., 1991; Evans & Hofmann, 2008] e invertebrados marinos [Prinsep et al., 1991; Harwood et al., 2003] y también han sido producidos mediante síntesis orgánica [Hollinshead et al., 1990; Li et al., 2010]. Los alcaloides  $\beta$ -carbolina se encuentran presentes en los alimentos para el consumo humano pudiendo ser el origen de estos alcaloides en varios de sus tejidos y fluidos fisiológicos [Cao et al., 2007]. Independientemente de su origen se ha propuesto que las  $\beta$ -carbolinas podrían actuar como moduladores endógenos del receptor GABA<sub>A</sub>/BDZ [Rommelspacher et al., 1980; Braestrup & Nielsen, 1981; Braestrup et al., 1981; Robertson, 1980 citado en Frosthholm et al., 2000; Evans & Lowry, 2007] pues tienen la capacidad de actuar como agonistas totales, parciales o inversos [Hale et al., 2010] o bien como antagonistas de dicho receptor, provocando efectos ansiolíticos, sedativos, [Aricioglu & Altunbas, 2003; Hilber & Chapillon, 2005], anticonvulsivantes [Cox et al., 1998], ansiogénicos [Skolnick et al., 1984; Crawley et al., 1985], proconvulsivantes y convulsivantes [Braestrup et al., 1982].

Adicionalmente, las  $\beta$ -carbolinas se unen a receptores de imidazolina [Husbands et al., 2001], poseen propiedades alucinógenas [Auta et al., 1997; Cao et al., 2007; Evans & Hofmann, 2008]. Efectos extras incluyen: actividad antitumoral [Li et al., 2010; Nafisi et al., 2010], antiinflamatoria [Chen et al., 2010], activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> [Glennon et al., 2000], inhibición del transporte del  $\gamma$ -hidroxibutirato sinaptosomal [McCormick & Tunnicliff, 1998], inhibición de las enzimas monoaminooxidasas (MAO) [May et al., 1990; Rommelspacher et al., 1994; Anderson et al., 2003; Herraiz et al., 2010].

### 1.2.2 Liriodenina

La liriodenina (Figura 7) es un alcaloide BIQ aislado por primera vez de la *Liriodendron tulupifera* [Buchanan & Dickey, 1960] y subsecuentemente de las familias Rutaceae, Magnoliaceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Annonaceae etc. [Guinaudeau, 1988]; debiendo destacarse que de esta última familia la liriodenina ha sido aislada de varios géneros y especies, entre ellas, *Annona glabra* [Warthen et al., 1969], *Annona cherimolia* [Villar del Freno, 1985], *Annona purpurea* (Cuadro 2) [Chen et al., 1997 citado en Chang et al., 2000] y *Annona diversifolia* (Cuadro 3) [González-Esquinca, 2001].



**Figura 7. Estructura química de la liriodenina, alcaloide BIQ [Buchanan & Dickey, 1960]**

### **1.2.2.1 Actividades farmacológicas**

La liriodenina es un alcaloide que tiene un amplio rango de actividades biológicas, entre ellas es antimicrobiana [Clark *et al.*, 1987; Villar *et al.*, 1987; Mbah *et al.*, 2004], anticancerígena [Woo *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005], posee efectos cardiovasculares [Chulia *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2001, 2004], y tiene afinidad por algunos receptores [Protais *et al.*, 1995; Chulia *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2007].

### **1.2.2.2 Actividad antimicrobiana**

La liriodenina tiene eficacia antimicótica, la cual fue determinada en el modelo de diseminación de candidiasis en el ratón. Los ratones fueron infectados con una dosis letal de *Candida albicans*, 7 h posinfección los ratones recibieron diferentes dosis de liriodenina (0.5 y 1 mg/kg; i.p.). Se observó reducción en el número de unidades formadoras de colonias (CFU) en el tejido renal obtenido entre los animales tratados y los que recibieron el vehículo [Clark *et al.*, 1987]. La liriodenina posee también actividad contra varios microorganismos (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lysteria*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Shigella*, *Mycobacterium* y *Plasmodium falciparum*) [Villar *et al.*, 1987; Mbah *et al.*, 2004].

### **1.2.2.3 Actividad anticancerígena**

Para explicar la actividad citotóxica de la liriodenina en células neoplásicas se han propuesto tres niveles de acción; la inhibición de la topoisomerasa II, el bloqueo del ciclo celular y la inducción de la apoptosis.

Con relación a la primera, en células CV-1 (células de mono verde africano) infectadas con CV40 (Virus de Simio 40), la liriodenina inhibe la topoisomerasa II, enzima necesaria para la replicación del DNA y separación de las réplicas recientes en cromosomas de células eucarióticas [Woo *et al.*, 1997].

En células humanas de adenocarcinoma pulmonar (A549) la liriodenina bloqueó la progresión del ciclo celular en la fase G2/M por la vía de la acumulación en la fase G2 de ciclinas (B1) y la inhibición de la actividad de la cinasa del complejo B1/CDK1. Las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), y las cinasas inhibitorias dependientes de ciclinas (CDKIs) están involucradas en la progresión del ciclo celular [Chang *et al.*, 2004].

Por otra parte, en este mismo estudio se observó que la liriodenina causa muerte celular por activación de caspasas. La degradación de la proteína PARP fue observada con el tratamiento de liriodenina a las células A549, esta proteína es sustrato para varias caspasas, presentándose la inducción de apoptosis, el número de células apoptóticas (PI-negativas y anexinas-V-positivas) se incremento después del tratamiento con la liriodenina [Chang *et al.*, 2004].

La liriodenina inhibió la proliferación de células de hepatoma humanas, de las líneas celulares Hep G2 y SK-Hep-1, bloqueando el ciclo celular en la transición de la fase G1-S de manera dosis dependiente. La liriodenina por otro lado, incrementa los niveles de óxido nítrico (ON) intracelular simultáneamente con el bloqueo de la fase G1 del ciclo celular en células Hep G2. El ON es un inhibidor de la proliferación celular y reversiblemente inhibe la síntesis de DNA (Nakaya *et al.*, 2000 citado por Hsieh *et al.*, 2005). A bajas concentraciones el ON induce crecimiento celular y protege a muchos tipos de células de la apoptosis, a altas concentraciones inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis [Kim *et al.*, 2001 citado por Hsieh *et al.*, 2005].

La liriodenina induce la proteína p53, la cual es supresora tumoral. Dependiendo del contexto celular exacto, la p53, actúa causando bloqueo del ciclo celular o apoptosis en respuesta a tensiones celulares [Bargonetti & Manfredi, 2002. citado por Hsieh *et al.*, 2005].

#### **1.2.2.4 Efectos cardiovasculares**

Se encontró en estudios electrofisiológicos usando tiras aisladas de músculo cardiaco de rata, que la liriodenina bloquea los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, prolonga el potencial de acción por incremento en la entrada de Ca<sup>2+</sup> y puede suprimir la arritmia ventricular [Chang *et al.*, 1996]. Estos resultados colocan a la liriodenina como un potencial agente antiarrítmico. Más aún, en el modelo de Langendorff de isquemia y reperfusión utilizando corazón de rata Sprague–Dawley, este alcaloide a concentración de 1µM significativamente promovió la recuperación del flujo coronario y disminuyó el infarto miocárdico comparado con el grupo control [Chang *et al.*, 2001, 2004].

#### **1.2.2.5 Efectos sobre algunos receptores**

La liriodenina se comporta como un antagonista muscarinico M<sub>3</sub> pues los efectos de este alcaloide en pruebas de desplazamiento de radio-ligando y de la relajación del musculo liso de la traquea canina inducida por agonista fueron similares a los de la 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina, un antagonista selectivo para los receptores M<sub>3</sub> [Lin, 1994]. Por otro lado, la liriodenina ocasionó la relajación de la contracción inducida por la noradrenalina en la aorta de rata, lo que sugiere que también posee actividad antagonista alfa<sub>1</sub> [Chulia *et al.*, 1995].

Finalmente, la liriodenina mostró actividad ansiolítica en la caja luz/oscuridad, un modelo no condicionado de ansiedad [Estrada-Reyes, 2005] e inhibió la síntesis y liberación de dopamina *in situ* [Jin *et al.*, 2007].



### 1.3 Descripción botánica de las especies estudiadas

**Cuadro 2. Descripción botánica de la *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal [González-Esquinca, 2001]**

***Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal, Monogr. Anonac. 64, t. 2. 1817**

**Tipo: Sessé & Mociño Icon. Pl. (Holotipo: HU)**

*Annona manirote* Kunth, Nov. Gen. Sp. 5: 59. 1821

Tipo: Provincia de la Nueva Guayana, Angostura, Humboldt & Bonpland s.n.

*Annona involucreta* Baill. Adansonia 8: 265. 1867-1868

Tipo: No localizado

*Annona Prestoei* Hemsl, Hooker's Icon. Pl., ser. 4, 6: t. 2519 –20. 1888

Tipo: No localizado

**Descripción:** Árbol de 10 m o más, con copas anchas y extendidas, las ramas jóvenes densamente ferrugineas-tomentosas; hojas deciduas, membranosas con pedicelos de 3 – 5 mm de largo, de ovadas a elíptico ovadas, en su mayor parte de 12 a 30 cm de largo y de 6 -14 cm de ancho, ápice acuminado, redondeadas en la base, verdes y glabras por el haz y pálidas a moreno velludo aún con la edad, por el envés; flores extraaxilares, solitarias, subsésiles; sépalos triangular-ovados, acuminados, 1 – 2 cm de largo, pétalos exteriores valvados, gruesos y rígidos, ovado-lanceolados, cuando mucho de 5 cm de largo y 2 cm de ancho, ferrugíneos-seríceos en el exterior, los pétalos internos imbricados, delgados, elíptico-oblongos, redondeados en el ápice, 2.5 cm de largo, 1.5 cm de ancho; fruto subgloboso, de 10 a 12 cm de diámetro o de largo, cubierto con un tomento semejante a fieltro y con pelos piramidales puntiagudos muy numerosos; semillas ovoides, castañas, 3 cm longitud [Standley & Steyermark, 1946].

**Distribución:** Honduras Británica; Costa Rica; Panamá (zona del canal e isla de Barro Colorado); Venezuela (Bolívar, Caracas, Dos Caminos, Orinoco y Trinidad); México (Tlatatla, Córdoba y La Antigua en Veracruz y en Yucatán) Fries (1937). Guatemala (Izabal, Chiquimula, Juteapa, Santa Rosa, Retalhuleu y San Marcos) [Standley & Steyermark, 1946]. En Chiapas, se ha recolectado en los municipios de Tuxtla Gutiérrez, San Fernando y Cintalapa.

**Nombres comunes:** También llamada cabeza de negro, cabeza de ilama, chincua, chincuya, ilama, soncoya [Morton, 1987]

**Propiedades medicinales:** En México el jugo se utiliza como remedio para la fiebre y la gripe [Martínez, 1996]. En otras partes de América tropical, el fruto se emplea para aliviar la ictericia. La decocción de la corteza es efectiva contra la disentería y la infusión de la corteza interna es útil para el tratamiento del edema [Chang *et al.*, 2000]. El extracto de las semillas es tóxico, además se emplea como insecticida [Morton, 1987]. Con respecto al fruto, su uso es exclusivamente alimentario, la pulpa se consume cruda o con el jugo como bebida refrescante.

**Cuadro 3. Descripción botánica de la *Annona diversifolia* Saff [González-Esquinca, 2001]**

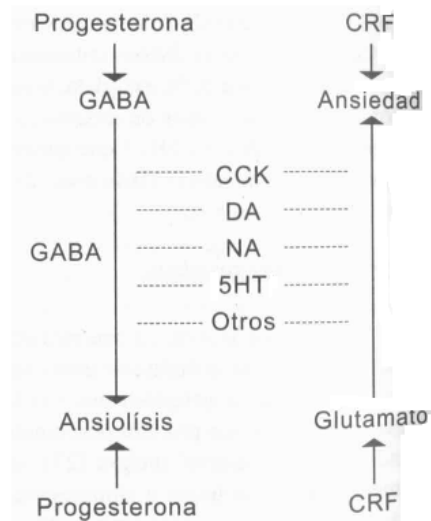
<p><b><i>Annona diversifolia</i> Saff., Science 33: 471. 1911.</b></p>
<p><b>Tipo: México, Colima Palmer 60 (Holotipo: US)</b> Árbol pequeño, de ramas glaucas, completamente glabras; hojas pecioladas, de 8 – 18 mm de largo, 4 – 6 cm de ancho, redondeadas o subagudadas en el ápice, agudas o redondeadas en la base, glabras en el envés; las hojas inferiores a los brotes florales orbiculares y cordado-ceñidas, 2 – 4 cm de largo; flores solitarias, pedicelos adelgazados, glabros, recurvados o péndulos, 3 – 5 cm de largo, bracteolados por debajo de la mitad; sépalos redondeados a triangulares, ferrugíneo-pilosos por fuera, 2 – 3 mm de largo; pétalos exteriores linear-oblongos, obtusos, pubescentes por fuera, 2.5 cm de largo, cerca de 6mm de ancho en la base, los pétalos internos rudimentarios; frutos ampliamente ovoides, tomentosos, generalmente 13 – 15 cm de largo y 12 – 15 cm de ancho, cubierto con protuberancias ligeramente redondeadas; semillas oblongo-ovoides de 2 cm de largo, por 1 cm de ancho [Standley &amp; Steyermark, 1946].</p>
<p><b>Distribución:</b> Sur de México en la costa del Oceano Pacífico; Guatemala en Chiquimula, Jutiapa y Chimaltenango y El Salvador (Standley &amp; Steyermark, 1946). Fries (1937) también la reporta en Colima (México) y El Salvador. En Chiapas, se ha recolectado en los municipios de Tuxtla Gutiérrez, Chiapa de Corzo y Chicoasén.</p>
<p><b>Nombres comunes:</b> Es conocida como ilama, ilama zapote, ilamazapotl (Nahuatl), izlama, hilama, zapote de vieja, papauce, papausa y anona blanca [Popenoe, 1920; Ruíz &amp; Morett, 1997, citados por Carballo <i>et al.</i>, 2010].</p>

#### **1.4 Modelos conductuales para el estudio de la ansiedad**

La ansiedad puede ser una respuesta fisiológica de adaptación ante una amenaza, cuando esta respuesta es excesiva en la intensidad, la frecuencia o la duración, perdiéndose la adaptabilidad, se puede desarrollar la ansiedad patológica [Barlow, 2002 citado por Hofmann *et al.*, 2011]. La ansiedad patológica es un desorden psiquiátrico que afecta a una gran cantidad de personas en el mundo y que se ha incrementado en los últimos años, por lo que se le considera un problema importante de salud pública. Dicho incremento ha sido atribuido al estilo de vida actual donde predomina la alta competitividad [Dhawan *et al.*, 2001]. Este tema ampliamente estudiado, es complejo y multidimensional. La ansiedad también se define como un estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante. Regularmente se acompaña de manifestaciones autonómicas como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular, insomnio, entre otras [Kidman, 1989; Basile *et al.*, 2004].

Diferentes aspectos de la ansiedad están modulados por varios sistemas de neurotransmisores localizados en distintas áreas anatómicas; estos incluyen neurotransmisores peptidérgicos tales como la colecistoquinina (CCK), hormona liberadora de corticotropina, neuropéptido Y, sustancia P, transmisores monoaminérgicos: noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y dopamina (DA) y aminoácidos transmisores: el ácido gama-aminobutírico (GABA) y el glutamato [Ninam, 1999; Gorman *et al.*, 2002; Charney, 2003]. Cabe señalar que estos sistemas de neurotransmisores son de importancia crítica en el sistema límbico, incluyendo la amígdala, la cual es crucial en las respuestas del miedo y la ansiedad (Figura 8).

El tratamiento efectivo para la ansiedad se apoya en la psicoterapia y el tratamiento farmacológico con compuestos ansiolíticos, dentro de este enfoque, los agonistas GABAérgicos (benzodiazepinas (BZD); v.g. el diazepam), los agonistas serotoninérgicos del tipo de la buspirona y antidepresivos (inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina) son los más utilizados [Davidson *et al.*, 2010; Franklin & Foa, 2011; Rynn *et al.*, 2011]. Por desgracia, el uso de las benzodiazepinas se acompaña de efectos adversos como sedación, relajación muscular, pérdida de la coordinación motriz, amnesia entre otros malestares. Por otra parte, la utilización de la buspirona requiere de una espera de 7 a 14 días para que su efecto tenga repercusión clínica. Por estas razones la búsqueda de fármacos para tratar la ansiedad con un perfil de acción más favorable, continúa.



**Figura 8. Interacción de sistemas de neurotransmisores en la amígdala en relación a la ansiedad. Aunque un neurotransmisor pudiera tener efectos ansiogénicos o ansiolíticos, dependiendo de la localización de la sinapsis en donde se libera, se sugiere que dentro de la amígdala, las influencias ansiolíticas o ansiogénicas globales corren a cargo de los sistemas GABAérgicos y glutamaérgicos respectivamente. El resto de los sistemas de neurotransmisión, así como los supuestos moduladores endógenos de la ansiedad, ejercerían sus efectos sobre ésta, modificando el equilibrio entre ambos sistemas [Con autorización de Pérez de la Mora *et al.*, 2007].**

Durante los últimos 50 años un gran número de pruebas en animales han sido desarrolladas para identificar compuestos que tienen actividad ansiolítica. El concepto de modelo animal puede definirse como la preparación experimental que se desarrolla en una especie con el propósito de estudiar los fenómenos que ocurren en otra especie distinta. Roedores y humanos comparten más del 90% de sus genes y se ha visto que estos modelos son útiles en farmacología. El utilizar modelos de ansiedad con ratones, ofrece la ventaja de ensayar en ellos diversas técnicas experimentales que en los seres humanos no sería posible. Cuando se exploran extractos y alcaloides, que se extraen de los diferentes órganos de las plantas, por lo regular estos compuestos, se obtienen en cantidades pequeñas (miligramos), por lo que el utilizar modelos experimentales con ratones, permite el óptimo empleo de este recurso.

En términos generales se puede dividir a los modelos de ansiedad en dos grandes grupos: en el primero, el modelo involucra respuestas condicionadas y en el segundo, se estudian conductas innatas no condicionadas.

#### **1.4.1 Modelos conductuales condicionados**

El término condicionado se refiere a un proceso llamado condicionamiento clásico, que ocurre cuando un estímulo neutral (sonido, luz, etc.) es seguido de un estímulo aversivo o nocivo (choque eléctrico, dolor, etc.). Después de varias repeticiones de este proceso, se puede lograr una respuesta emocional condicionada aunque ya no se aplique el estímulo nocivo, bastará que el animal perciba el estímulo condicionado antes neutral para responder emocionalmente. Los modelos condicionados permiten un control muy preciso de la conducta que se mide, pero requieren necesariamente de un entrenamiento exhaustivo de los animales, que son expuestos a estímulos no habituales y un control muy cuidadoso de las posibles interacciones y/o efectos no específicos del tratamiento con la memoria/aprendizaje, el apetito y/o la función perceptual [LeDoux, 2000; Maren, 2001, Debiec *et al.*, 2004].

#### **1.4.2 Modelos conductuales no condicionados**

Contrariamente las pruebas no condicionadas, no requieren de entrenamiento, por lo que son menos susceptibles a procesos motivacionales pues son de ensayo único y se basan en respuestas espontáneas de la conducta del animal [Rodgers, 1997], que se asemejan a lo que podría ocurrirle en su ambiente natural. Estas observaciones han permitido el desarrollo de una serie de paradigmas basados en la observación de una variedad de conductas del roedor y la mayoría de los procedimientos conductuales para el estudio farmacológico de la ansiedad, se basan en este tipo de pruebas [Clement *et al.*, 2007]. Entre las pruebas de mayor uso se encuentran: la de campo abierto, el laberinto elevado en forma de "+", la caja luz/oscuridad, el enterramiento de canicas y la plataforma agujereada. Estas pruebas no requieren de un alto costo económico para su implementación y están al alcance de cualquier laboratorio universitario de investigación.

### **1.4.2.1 Prueba de campo abierto**

Inicialmente descrita por Hall (1934), monitorea el grado de “emocionalidad” (ansiedad) del animal. La prueba consiste en colocar a un roedor en un medio ambiente desconocido. Hall tomó como primeras medidas sugerentes de ansiedad a la defecación y la micción. La prueba ha evolucionado y se ha enriquecido con aportaciones de varios investigadores, entre las que destacan según Archer (1973) las de Broadhurst (1957, 1958), Fries (1964) y Walden (1968) [Archer, 1973].

La prueba de campo abierto en la actualidad es ampliamente utilizada para evaluar tanto a la ansiedad como a la actividad locomotriz, así mismo es una prueba que permite que el ratón exhiba un amplio rango de conductas. La prueba se registra durante 5 minutos y típicamente dos medidas son por lo regular recolectadas: el total de la distancia recorrida (número de líneas cruzadas marcadas en el piso, considerada como la actividad locomotriz) [Silvania *et al.*, 2004] y el tiempo de permanencia en el área central de la caja (en la consideración que el área central de la caja es más amenazante que la periferia, basado en que la permanencia del roedor en el área central se incrementa con drogas ansiolíticas) [Lipkind *et al.*, 2004]. En la prueba se pueden también registrar otras conductas, tales como: la frecuencia del acicalamiento, de los levantamientos con apoyo de las patas traseras, de la micción y de la defecación, así como cualquier otra conducta bizarra. Esta información adicional incrementa la posibilidad de dilucidar el perfil farmacológico de las sustancias en estudio. Además, la prueba es por otro lado crucial para poder tomar la decisión de continuar o no el proceso experimental con otra prueba no condicionada, ya que estas pruebas son exploratorias y se requiere que la actividad locomotriz del roedor no esté afectada. De ser así y si las posibilidades lo permiten, se puede ajustar la dosis de los compuestos usados, pues de lo contrario los resultados en las siguientes pruebas destinadas para evaluar la ansiedad, carecen de validez.

### **1.4.2.2 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”**

Es un modelo válido para evaluar la ansiedad [Pérez de la Mora *et al.*, 2006, 2007, 2010], porque utiliza estímulos naturales (miedo a los espacios abiertos y miedo a caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha) que inducen ansiedad en humanos [Dawson *et al.*, 1995]. También se atribuye que el miedo que genera en los roedores se debe a la falta de estímulos tigmotácticos (ausencia de paredes) [Treit *et al.*, 1993]. Originalmente desarrollada con ratas [Pellow *et al.*, 1985], en la actualidad se ha validado su uso con ratones [Lister, 1987]. En este método se utiliza un laberinto en forma de + y la prueba dura 5 minutos. La disminución de la actividad exploratoria de los brazos abiertos es causada por el miedo o la ansiedad que les inspira adentrarse en dichos brazos, por lo que el uso de compuestos ansiolíticos incrementa esta actividad [Grundmann *et al.*, 2006].

#### **1.4.2.3 Prueba de la caja luz/oscuridad**

Se desarrolló inicialmente para ratones [Crawley & Goodwin, 1980]. El principal factor ansiogénico está fundamentado por el conflicto entre el comportamiento exploratorio del ratón y la aversión natural hacia el área abierta e iluminada (brillante) de esta prueba. La prueba tiene una duración de 10 minutos, y se considera que un incremento en el número de transiciones entre el lado oscuro y brillante de la caja y/o un aumento en el tiempo de permanencia en el lado iluminado indica una reducción en la ansiedad. Aunque los roedores pueden explorar con libertad ambos compartimientos, muestran una clara preferencia a permanecer en el lado oscuro, las BDZ, buspirona, antagonistas 5HT<sub>3</sub>, entre otros agentes ansiolíticos incrementan la exploración del área iluminada así como las transiciones entre ambos compartimientos [Costall *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 2007].

#### **1.4.2.4 Prueba de enterramiento de canicas**

Los roedores usan el material de su caja para enterrar los objetos que consideran nocivos o amenazantes. Sobre esta base, las canicas de vidrio se encuentran entre los estímulos que les ocasiona aversión, esto podría ser resultado de la novedad que estos objetos representan en su ambiente y el enterramiento de las canicas se vería como la conducta apropiada porque quita la fuente del estímulo aversivo. La inhibición de esta conducta ha sido propuesta como prueba para identificar compuestos ansiolíticos [Njung'e & Handley, 1991; Ichimaru *et al.*, 1995]. Esta prueba es sensible a diazepam, fluoxetina, fluvaxamina (inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina), imipramina, clomipramina (antidepresivos tricíclicos), mianserina, 8-OH-DPAT (agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>) [Borsini *et al.*, 2002].

Alternativamente se ha propuesto que el enterramiento es una conducta compulsiva, porque los inhibidores de la recaptura de la serotonina que se utilizan para tratar el trastorno obsesivo compulsivo en humanos, inhiben esta conducta [Njung'e & Handley, 1991]. Más aún, la fluvaxamina que es un inhibidor selectivo de la recaptura de la serotonina, inhibe la conducta de enterramiento y esta inhibición es antagonizada por el NAN-190, un antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

Además, el 8-OH-DPAT, agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, inhibe esta conducta sin afectar la actividad locomotriz y esta inhibición se revierte por el WAY100135, antagonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Lo que sugiere la participación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en la inhibición de esta conducta [Matsushita *et al.*, 2005].

#### **1.4.2.5 Prueba de la plataforma con orificios**

Fue introducida en 1962 por Boisser & Simon. El uso de esta prueba para evaluar sustancias ansiolíticas está basado en la hipótesis de Montgomery (1955) [Saitoh *et al.*, 2006] de que el ratón expuesto a un nuevo ambiente le crea un conflicto entre el temor generado por la novedad de la situación y su tendencia natural a explorar [Da Silva & Elisabetsky, 2001]. Hay una variedad

de diseños [Ohl *et al.*, 2001; Kameia *et al.*, 2004], aunque algunos equipos son automatizados, registrando por medio de sensores las veces que el ratón se asoma a los orificios del dispositivo, el utilizar sistemas de grabación (video-tape), permite obtener una calificación confiable de los resultados. El número de exploraciones guarda una relación inversa con el estado de ansiedad del animal, compuestos ansiolíticos como las benzodiazepinas incrementan de manera dosis dependiente el número y la duración de las exploraciones a los orificios [Takeda *et al.*, 1998].

#### **1.4.2.6 ¿Cómo escoger el modelo adecuado?**

El escoger un modelo animal de ansiedad que refleje con fidelidad este estado en los humanos no es fácil. Mediante el uso de los modelos anteriores lo que nosotros estudiamos es como una determinada situación experimental o un determinado fármaco modifica las situaciones aversivas impuestas por la prueba escogida, sin que estas puedan equipararse totalmente con las conductas que se observan en la clínica. No obstante sus limitaciones, los modelos animales siguen siendo útiles para predecir el efecto que un determinado fármaco ejercerá sobre la ansiedad y su validación, aunque considera algunos aspectos conductuales descansa esencialmente en criterios farmacológicos. De acuerdo con este criterio, fármacos de conocida actividad ansiolítica como las BDZ deberán modificar favorablemente aquellos parámetros que en la prueba bajo escrutinio se consideran ansiolíticos, y al revés compuestos con acciones opuestas en humanos deben reflejar una acción ansiogénica. Por supuesto, agentes que no tienen efectos en la clínica sobre la ansiedad, no deberán tenerlo tampoco en estas pruebas. Sin embargo, habrá que mencionar que algunos agonistas 5HT<sub>1A</sub>, como la buspirona que tiene efectos ansiolíticos en la práctica médica, es incapaz de comportarse como ansiolítico en algunos modelos animales de ansiedad [Belzung & Griebel, 2001].

#### **1.4.2.7 Pruebas para el estudio de la actividad dopaminérgica**

##### **1.4.2.7.1 Prueba de la barra**

La catalepsia experimental en los animales de laboratorio se define como la imposibilidad de corregir una postura que ha sido impuesta externamente, considerándose su duración como una medida de su intensidad. Un animal en circunstancias normales que es colocado en una postura extraña cambia de posición en pocos segundos; en cambio, bajo los efectos de la catalepsia el animal puede mantener dicha postura durante un período prolongado de tiempo [Sanberg *et al.*, 1988; Champatisingh *et al.*, 2011]. Este estado de inmovilidad es considerado un modelo animal apropiado para el estudio de los efectos extrapiramidales en sujetos humanos tratados con fármacos neurolépticos.

Se ha demostrado, que la catalepsia está mediada principalmente por receptores dopaminérgicos posinápticos localizados en el estriado [Sanberg, 1980]. Este hecho ha sido constatado en estudios donde se observó que lesiones de dicha estructura con inyecciones de ácido kaínico o ácido

quinolínico, que destruyen neuronas que poseen receptores dopaminérgicos, bloquean la catalepsia inducida por la administración del haloperidol, antagonista dopaminérgico [Calderon *et al.*, 1988].

Aunque se conocen dos familias de receptores dopaminérgicos; los receptores de dopamina clase D1 (D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>) y los receptores de dopamina clase D2 (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) [Beaulieu & Gainetdinov, 2011], los más estudiados son los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Actualmente parece evidente que ambos receptores están involucrados en el fenómeno de la catalepsia. El SCH-23390 y el SKF-83566, antagonistas selectivos de los receptores D<sub>1</sub>, producen catalepsia en la rata y el ratón, al igual que la molindona, que es un antagonista selectivo de los receptores D<sub>2</sub> [Lappalainen *et al.*, 1989; Wanibuchi & Usuda, 1990; Meyer *et al.*, 1992; Ahlqvist *et al.*, 2003]. El hecho de que el haloperidol muestre un mayor poder cataleptogénico podría estar relacionado con su efecto de bloqueo de ambos receptores, que daría lugar a un efecto aditivo [Klemm, 1985<sup>a</sup>]. Por otra parte, otros antagonistas dopaminérgicos D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, como la sulpirida, pueden producir también catalepsia en ratones, aunque sólo tras la administración de dosis muy altas [Fujiwara, 1992; Ahlqvist *et al.*, 2003].

La administración conjunta de un agonista D<sub>2</sub> (que inhibe la liberación de dopamina por activación de los autoreceptores D<sub>2</sub>) y un antagonista D<sub>1</sub> ocasiona una potenciación de los niveles de catalepsia. Así, Puglisi-Allegra & Cabib (1988) comprobaron que el antagonista D<sub>1</sub> SCH-23390 y el agonista D<sub>2</sub> quinpirola (en dosis bajas), inyectados conjuntamente, producían altos niveles de catalepsia en ratones.

Por otro lado, se ha encontrado que la administración de YM-09151 (1.2 mg/kg), un antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, produce catalepsia en ratas y que este efecto se ve sensiblemente reducido con la inyección de los agonistas D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> apomorfina y bromocriptina respectivamente [Wanibuchi & Usuda, 1990]. Estos autores han comprobado también que la administración de YM-09151, en combinación con SCH-23390, produce un marcado incremento de la catalepsia, en comparación con los efectos originados por la inyección de ambas sustancias por separado. Dicha potenciación del nivel de la catalepsia se debería, en opinión de los autores, al sinergismo que se produce por la administración simultánea de ambos compuestos entre los dos antagonismos dopaminérgicos utilizados.

Aunque la catalepsia constituye una medida conductual extensamente utilizada en psicofarmacología, no existe todavía una clara estandarización en las pruebas empleadas para su medida. La prueba de catalepsia más utilizada por distintos investigadores es la "prueba de la barra", que consiste en colocar las patas delanteras del animal sobre una barra que está situada a una altura determinada del suelo, apropiada para el animal, permaneciendo sus patas traseras apoyadas en el mismo, y contabilizándose el tiempo que el animal permanece en dicha postura. Aunque dicha prueba es posiblemente la más utilizada, existen otras muchas pruebas diseñadas para evaluar la conducta cataléptica (prueba de la rejilla, del bloque, de la plataforma, etc.). Actualmente el registro de esta conducta se ha automatizado con la implementación de un método controlado con microprocesador [Álvarez *et al.*, 2005].



#### **1.4.2.7.2 Prueba de hiperactividad inducida por AMPH**

La 1-metil-2-fenetilamina (AMPH; anfetamina) [Fleckenstein *et al.*, 2007] es una de las aminas simpaticomiméticas de acción indirecta más potente para estimular el SNC. Es un estimulante que ha sido utilizado para tratar varios desordenes, incluidos el déficit de atención, la narcolepsia y la obesidad. Varias líneas de evidencia indican que es a nivel de los transportadores vesiculares de dopamina donde actúa la AMPH, liberando las catecolaminas [Raiteri *et al.*, 1979]. El transportador de dopamina (DAT) es una de las proteínas más implicadas en sus propiedades de reforzamiento y abuso potencial [Fleckenstein *et al.*, 2007]. Es probable que algunos aspectos de la locomoción y del comportamiento estereotípico inducido por la AMPH sean consecuencia de descarga de dopamina desde las terminaciones nerviosas dopaminérgicas, y en particular el neocórtex [Hoffman & Lefkowitz, 1996].

### **1.5 Receptores**

Los receptores son proteínas transmembranales de la neurona, que tienen como función reconocer la estructura de una sustancia específica (ligando endógeno) que al unirse a su sitio de fijación, desencadena una señal o cadena de señalización para producir una acción molecular concreta. Se han identificado hasta ahora dos tipos de receptores de neurotransmisores; los receptores ionotrópicos, se encuentran asociados a canales iónicos que permiten el paso de iones hacia dentro o fuera de la neurona y constituyen vías de señalización rápida. Los receptores metabotrópicos, corresponden a proteínas que poseen siete dominios transmembranales acoplados en el interior celular a una proteína G, cuya activación ocasiona una serie de señales en cadena, con una respuesta celular lenta comparada con los receptores ionotrópicos [Greengard, 2001].

#### **1.5.1 Receptores GABAérgicos**

En el SNC el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio [Da Settimo *et al.*, 2007]. Está plenamente demostrada la participación del sistema GABAérgico en patologías como la ansiedad, depresión, convulsiones, esquizofrenia y desordenes del sueño [Thomsen & Ebert, 2002]. El GABA media su actividad a través de dos tipos de receptores; la familia de los receptores ionotrópicos, que se divide en dos subfamilias, los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> sobre la base de su capacidad para formar receptores funcionales endógenos heterodiméricos y homodiméricos, respectivamente y diferencias en sus propiedades fisiológicas y farmacológicas [Chebib *et al.*, 2000] y los receptores GABA<sub>B</sub> de la familia de los receptores metabotrópicos [Chebib *et al.*, 1999].

### **1.5.1.1 Receptores GABA<sub>A</sub>**

#### **1.5.1.1.1 Estructura**

Los receptores GABA<sub>A</sub> están formados como una combinación pentamérica de 8 tipos distintos de subunidades;  $\alpha$  (1-6),  $\beta$  (1-3),  $\gamma$  (1-3),  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\rho$ 1 (3) [Barnard *et al.*, 1998; Burt, 2003; Whiting, 2003]. El ensamble funcional que formará el receptor GABA<sub>A</sub> dependerá de el sitio donde las subunidades son expresadas en el SNC [Sieghart *et al.*, 1999]. Se desconoce la composición de subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> naturales, pero se cree que casi todos están compuestos de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  [Burt, 2003]. Además, hay variantes de empalmes de muchas de estas subunidades, el potencial de la diversidad estructural de receptores GABA<sub>A</sub> es enorme, los estudios de los receptores GABA<sub>A</sub> naturales sugieren que pueda haber por lo menos 20 combinaciones de subtipos de este receptor [McKernan & Whiting, 1996; Whiting, 2003]. La isoforma más frecuente en el adulto de un receptor GABA<sub>A</sub> comúnmente es formado por dos subunidades  $\alpha$ 1, dos subunidades  $\beta$ 2 y una subunidad  $\gamma$ 2 (Figura 9) [Sigel & Lüscher, 2011]. El sitio de unión para el GABA está localizado entre las subunidades  $\beta$ (2) y  $\alpha$ (1) y para las BDZ está en la interfase entre las subunidades  $\alpha$ (1) y  $\gamma$ (2) (Figura 9) [Smith & Olsen, 1995; Amin *et al.*, 1997; Sigel & Lüscher, 2011], ambas subunidades determinan la farmacología del sitio receptor de benzodiazepina [Burt, 2003]. También se postula recientemente como un sitio modulador para BDZ la interface entre las subunidades  $\alpha$ (1) y  $\beta$ (2) [Sigel & Lüscher, 2011].

Cada subunidad posee cuatro dominios transmembranales (M1-M4), el segundo dominio (M2) forma el canal. Un largo extremo extracelular N-terminal del dominio M1, se piensa que es el involucrado en la fijación de ligandos (GABA, BDZ, etc.). Una larga asa intracelular formada entre los dominios M3-M4, contiene residuos capaces de ser fosforilados y modificar las propiedades del receptor [Smart, 1997].

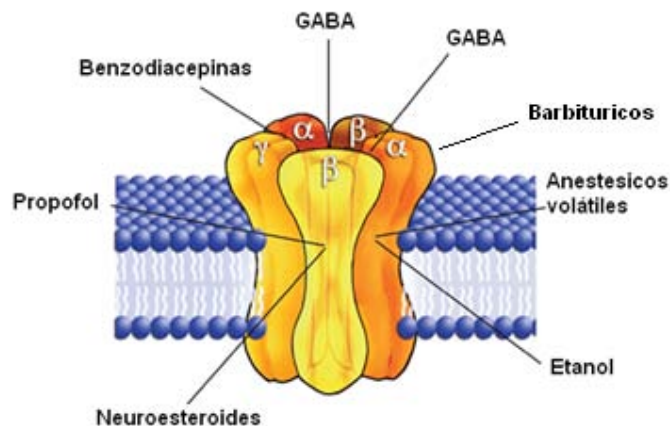
#### **1.5.1.1.2 Función y farmacología**

El GABA al unirse al receptor GABA<sub>A</sub> induce la apertura de un canal que permite la entrada del cloro (Cl<sup>-</sup>), con la consiguiente hiperpolarización membranal y la reducción de la excitabilidad neuronal. Una gran variedad de fármacos interactúan en varios sitios (Figura 9); en o cerca del sitio de unión al GABA. El muscimol se comporta como un agonista y sus acciones pueden ser selectivamente bloqueadas por antagonistas GABAérgicos del tipo de la bicuculina. En el canal hay sitios de unión para convulsivantes como la picrotoxina y algunos insecticidas (lindano) [Narahashi, 2002]. El receptor GABA<sub>A</sub> es regulado por varios moduladores alostéricos (esteroides, barbitúricos, BDZ) [Chebib & Johnston, 2000] y de ellos el sitio de fijación de las benzodiazepinas ha sido motivo de investigación durante las últimas cuatro décadas. La fijación de las BDZ a receptores GABA<sub>A</sub> es principalmente de localización posináptica; estudios electrofisiológicos *in vitro* han mostrado que la intensificación de las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducido por GABA que causan las BDZ es resultado de un incremento de la frecuencia de apertura de los canales de Cl<sup>-</sup>, producido por cantidades submáximas de GABA. La producción de los

efectos *in vivo* depende de la liberación presináptica de GABA, por lo que en ausencia de GABA las BDZ no tienen efectos sobre la función del receptor GABA<sub>A</sub> [Maksay *et al.*, 2000]. Los ligandos del sitio de fijación de las BZD al receptor GABA<sub>A</sub> pueden dar tres tipos de respuestas; los moduladores alostéricos positivos (agonistas) con efectos ansiolíticos y anticonvulsivantes, los moduladores alostéricos negativos (agonistas inversos) con respuestas ansiogénicas y convulsivantes y el antagonismo, que bloquea los efectos de los antes mencionados [Sigel & Lüscher, 2011].

### 1.5.1.2 Receptores GABA<sub>C</sub>

Los receptores GABA<sub>C</sub> están poco estudiados en comparación a los GABA<sub>A</sub>. Dichos receptores muestran una secuencia de aminoácidos similar a la de los receptores GABA<sub>A</sub>, a los de glicina sensibles a estricnina y a los nicotínicos y juntos forman parte de la superfamilia de receptores tipo canales iónicos con compuerta para ligando. Los receptores GABA<sub>C</sub> se distinguen de los GABA<sub>A</sub> por las diferentes propiedades de sus canales, la disponibilidad de agonistas selectivos, antagonistas y moduladores, así como la diferente localización cromosómica de los genes que codifican sus subunidades. Su distribución es menor en extensión y abundancia a los receptores GABA<sub>A</sub> pero hay evidencia de su existencia en la retina, hipocampo, médula espinal, pituitaria, colículo superior y tracto gastrointestinal [Johnston *et al.*, 2003; Chebib *et al.*, 2009]. Por otro lado, los receptores GABA<sub>C</sub> están relacionados a muchos aspectos funcionales y patologías del SNC, incluyendo, la memoria, miopía, dolor, sueño y enfermedad de Alzheimer's entre otras [Arnaud *et al.*, 2001; Froestl *et al.*, 2004 citado por Johnston *et al.*, 2010; Gibbs & Johnston, 2005; Liu *et al.*, 2005; Reis & Duarte, 2007; Chebib *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2010].



**Figura 9.** Sitios de fijación del GABA, benzodiazepinas y otros moduladores al receptor GABA<sub>A</sub> [Modificado de Bormann, 2000].

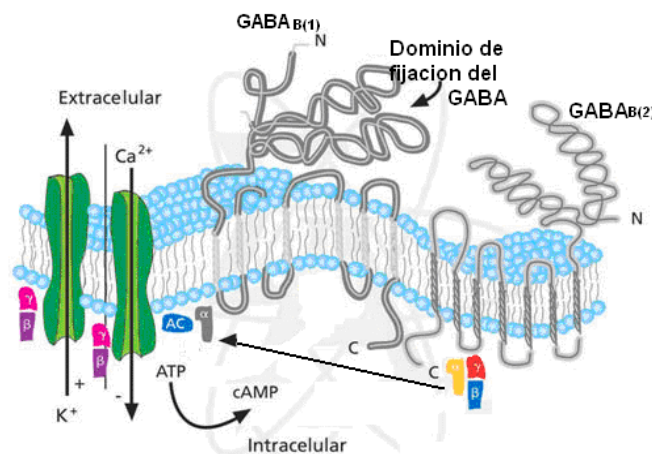
Farmacológicamente se han descrito algunos agonistas selectivos para este tipo de receptores entre los que se incluyen el (+)-CAMP (ácido [1S,2R] 2-amino-metileciclopropane-carboxílico) y el 5-Me-IAA (ácido 5-metil-1H-imidazol-4-acético). Como antagonistas competitivos se conocen el TPMPA (ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-yl) metilfosfínico), el (±)-cis-3-ACPBPA (ácido [±]-cis-

(3-aminociclopentamil) butilfosfínico) y el Aza-THIP (4,5,6,7-tetrahidropirazolo[3,4-c] piridin-3-ol). La alopregnanolona actúa como modulador positivo y la epipregnanolona como modulador negativo [Johnston *et al.*, 2010]. En contraste los receptores GABA<sub>C</sub> no son bloqueados por bicuculina (antagonista GABA<sub>A</sub>) y no son activados por baclofeno (agonista GABA<sub>B</sub>) [Chebib *et al.*, 1999].

### 1.5.1.3 Receptores GABA<sub>B</sub>

De igual manera que los receptores GABA<sub>A</sub>, los receptores GABA<sub>B</sub> contribuyen al potencial posináptico inhibitorio de las neuronas. Los receptores GABA<sub>B</sub> son receptores metabotrópicos que poseen siete dominios transmembranales, y que están acoplados a proteínas G<sub>i</sub> que inhiben la adenil ciclasa (AC), disminuyendo el AMP cíclico (AMP<sub>c</sub>) intracelular. Dichos receptores pueden a su vez abrir canales para el potasio (K<sup>+</sup>) y cerrar los de calcio (Ca<sup>2+</sup>) (Figura 10). Los receptores GABA<sub>B</sub> son selectivamente activados por el baclofeno y bloqueados por el faclofeno [Chebib *et al.*, 1999; Vacher & Bettler, 2003].

El agonista β-4-clorofenil-GABA (baclofeno; lioresal) es ampliamente utilizado como un agente antiespástico en el tratamiento de la espasticidad y rigidez músculo-esquelética en pacientes con lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y parálisis cerebral. Permanece como el único compuesto GABA<sub>B</sub> disponible para su uso en la clínica [Vacher & Bettler, 2003]. Aunque los receptores GABA<sub>B</sub> son expresados en sitios pre y posinápticos, el efecto terapéutico del baclofeno es mediado seguramente por receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos localizados en la médula espinal. La activación de estos receptores bloquea la liberación de neurotransmisores excitatorios en motoneuronas que participan en el arco reflejo monosináptico ocasionando la relajación de los músculos contraídos [Bowery, 1993].



**Figura 10. Ilustración de las subunidades del receptor GABA<sub>B(1)</sub> y GABA<sub>B(2)</sub> que forman al receptor heterodimérico GABA<sub>B</sub>. Cada subunidad posee siete dominios transmembranales, está acoplado a proteínas G<sub>i</sub> que inhibe la adenil ciclasa (AC), disminuyendo el AMP<sub>c</sub> intracelular, puede a su vez abrir canales para el K y cerrar los de Ca [modificado de Marshall *et al.*, 1999].**

#### **1.5.1.4 Síntesis**

EL ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es sintetizado a partir del ácido glutámico por  $\alpha$ -descarboxilación, acción irreversible mediada por la descarboxilasa de glutamato [Shi & Li, 2011].

#### **1.5.1.5 Biotransformación**

El GABA es inactivado principalmente por la recaptura mediante transportador ubicado en la glia y las neuronas, y por acción catalítica de la aminotransferasa de GABA, que lo transforma en semialdehído succínico, el cual a su vez es convertido, ya sea en ácido succínico por la deshidrogenasa de semialdehído succínico o en ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico por la reductasa de semialdehído succínico [McCormick & Tunnicliff, 1998; Wong *et al.*, 2003].

### **1.5.2 Receptores dopaminérgicos**

#### **1.5.2.1 Dopamina**

Es el más abundante agente neuromodulador del SNC. Del contenido total de catecolaminas del cerebro, la dopamina representa más del 50%, y se puede decir que es la catecolamina más importante, precisamente porque presenta una concentración encefálica más elevada que la noradrenalina. La dopamina se encuentra en grandes cantidades en los ganglios basales (en especial en el núcleo caudado), núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio, núcleo central de la amígdala, eminencia media y áreas restringidas de la corteza frontal. A pesar de existir innumerables conexiones, se ha prestado mayor atención a aquellas proyecciones largas que existen entre la sustancia negra y el tegmento ventral mesencefálico y sus puntos efectores en el cuerpo estriado, en las zonas límbicas de la corteza cerebral y otras regiones límbicas principales. Las vías dopaminérgicas pueden dividirse en tres grupos principales: las nigroestriatales, las mesocorticales y las tuberohipofisarias (Figura 11). Las funciones mejor conocidas del cuerpo estriado son las que se relacionan con el movimiento, las neuronas dopaminérgicas nigroestriadas están activas todo el tiempo, aunque su ritmo de descarga se incrementa con la actividad de la musculatura contralateral. La vía mesocortical esta involucrada en el proceso de adicción, se origina en el área tegmental ventral y se proyecta hacia la corteza cerebral [Escobar *et al.*, 2007]. Las neuronas del sistema tuberohipofisario, que se origina en el hipotálamo y se proyecta hacia la hipófisis, desempeñan un papel importante en la regulación de la liberación de las hormonas pituitarias, especialmente la prolactina, en cuya liberación la dopamina juega un papel inhibitorio importante [Civelli *et al.*, 1993; Halbreich *et al.*, 2003].

El sistema dopaminérgico está implicado en la regulación motora y la ejecución de tareas, juega por otro lado un papel importante en la modulación del miedo y la ansiedad, así como en las funciones cognitivas como la atención, el aprendizaje y la formación de memoria. Dicho sistema contribuye adicionalmente a mantener la atención, la ideación, la evaluación correcta de la realidad y la motivación. Está por otro lado implicado en todos aquellos

procesos en los que la motivación forma parte esencial de la conducta, ya sea fisiológica, para atender necesidades elementales del individuo, o patológica, creada por hiperestimulación del sistema, que es lo que ocurre en procesos de adicción a sustancias de abuso [Goodman, 2008; Dalley & Everitt, 2009; Nitsche *et al.*, 2010; Pérez de la Mora *et al.*, 2010].

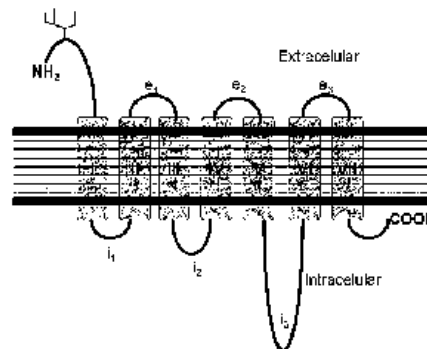


**Figura 11. Proyecciones del sistema dopaminérgico [Civelli *et al.*, 1993; Halbreich *et al.*, 2003; Escobar *et al.*, 2007].**

### 1.5.2.2 Clasificación

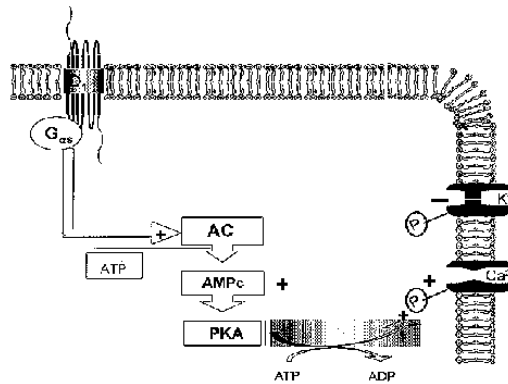
En los años 80 se propuso que había dos tipos de receptores dopaminérgicos que diferían en sus propiedades farmacológicas y bioquímicas, a los que se denominó D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Posteriormente, se han clonado hasta 5 receptores (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>), que han sido clasificados en dos subfamilias. Estas dos subfamilias se han denominado siguiendo la nomenclatura de los primeros dos receptores identificados, así la subfamilia D<sub>1</sub> incluye los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, y la subfamilia D<sub>2</sub> a las dos isóformas del receptor D<sub>2</sub>, que difieren en la longitud de su tercer asa citoplasmática, llamados D<sub>2S</sub> (D<sub>2</sub> corto) y D<sub>2L</sub> (D<sub>2</sub> largo), así como a los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> [Civelli *et al.*, 1993; Strange, 1993; Cooper *et al.*, 2003; Goodman, 2008; Beaulieu & Gainetdinov, 2011].

Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen sin embargo a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, con un extremo extracelular amino terminal, siete dominios transmembrana y un extremo intracelular carboxi terminal (Figura 12).



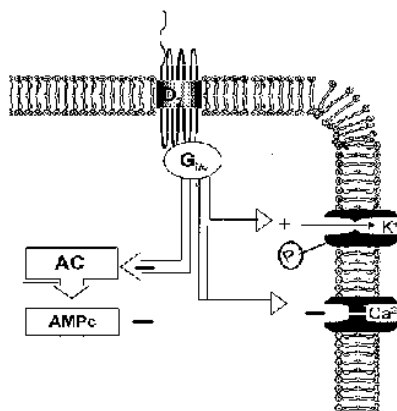
**Figura 12. Receptores de dopamina son acoplados a proteína G, con un extremo extracelular amino terminal, siete dominios transmembrana y un extremo intracelular carboxi terminal [Modificado de Bahena-Trujillo *et al.*, 2000].**

En cuanto a la señalización, existen diferencias entre ambas subfamilias. Los receptores  $D_1$  y  $D_5$ , actúan por medio de proteínas  $G_s$ , regulan positivamente la actividad de la AC, que a su vez se encarga de convertir el ATP en  $AMP_c$  (Figura 13).



**Figura 13.** La activación por agonistas del receptores  $D_1$ , ocasiona que la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_s$  estimule a la AC, como inicio de la respuesta celular [Modificado de Bahena-Trujillo et al., 2000].

En cambio los receptores  $D_2$ , actúan negativamente, por medio de proteínas  $G_i$  inhibiendo la actividad de la AC, disminuyendo la producción intracelular de  $AMP_c$  (Figura 14). La señalización de los autorreceptores  $D_2$  involucra adicionalmente una disminución de la fosforilación de la tirosina hidroxilasa en el caso de la supresión de la síntesis de dopamina, y posiblemente una modulación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  o  $K^+$  que limita la descarga de dopamina [Baldessarini & Tarazi, 1996]. Los receptores  $D_2$  son expresados en regiones responsables de las funciones motoras de la dopamina, mientras los receptores  $D_3$  se expresan con mayor frecuencia en regiones límbicas, asociadas con funciones cognitivas y emocionales [Cho et al., 2010].



**Figura 14.** La activación por agonistas de receptores  $D_2$ , ocasiona que la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_i$  inhiba a la AC, disminuyendo la concentración de  $AMP_c$  intracelular [Modificado de Bahena-Trujillo et al., 2000].

### 1.5.2.3 Síntesis

El precursor de la dopamina es el aminoácido tirosina, adquirido a través de la dieta. La tirosina es transportada hasta el cerebro por sistemas de transporte de aminoácidos de baja afinidad, y llega a las neuronas dopaminérgicas a través del espacio extracelular de donde es tomado merced a transportadores de aminoácidos de baja y alta afinidad presentes en ellas. Una vez en las neuronas, la tirosina es convertida en L-DOPA por acción del enzima citosólica tirosina hidroxilasa (TH) (Figura 15). La TH, es la enzima limitante y primer paso en la biosíntesis de las catecolaminas: la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina [Zigmond *et al.*, 1989; Nagatsu, 1991], por lo que la regulación de la actividad de esta enzima es muy importante para la síntesis de catecolaminas en su conjunto. La actividad de la TH puede ser regulada por dos mecanismos; a corto plazo sobre la actividad directa de la enzima o a mediano y largo plazo sobre su expresión génica (Khmer, 1996, citado por Fujisawa & Okuno, 2005). En seres humanos se ha observado que la deficiencia de TH se caracteriza por rigidez generalizada, hipocinesia y menores niveles de noradrenalina y metabolitos de dopamina en el líquido cefalorraquídeo [Wevers *et al.*, 1999].

La enzima descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (DAA) es la encargada de convertir la L-DOPA en dopamina, paso que también tiene lugar en el citosol [Elsworth & Roth, 1997]. La DAA, a diferencia de la TH no es una enzima específica pues parte de la DAA descarboxila al L-5-hidroxitriptofano en neuronas serotoninérgicas y en células pineales, para producir serotonina [Ichinose & Nagatsu, 1993]. En las neuronas dopaminérgicas, la dopamina es transportada y almacenada en las vesículas sinápticas donde se llega a alcanzar una concentración 10-1000 veces superior a la del citosol. Tras la llegada de un potencial de acción, la dopamina es liberada a la sinapsis por exocitosis, proceso en el cual se produce una entrada de iones calcio que permiten la fusión de las vesículas con la membrana neuronal [Elsworth & Roth, 1997]. Diversas drogas como la amfetamina actúan aumentando la liberación de dopamina de las vesículas al espacio sináptico.

En las terminales dopaminérgicas existen sistemas de transporte de alta afinidad que juegan un papel decisivo en el mantenimiento de la homeostasis del neurotransmisor. Se trata de proteínas de membrana capaces de transportar dopamina en ambas direcciones dependiendo de la existencia de gradientes de concentración por lo que bajo condiciones normales la dopamina liberada a la sinapsis es nuevamente transportada hacia la terminal nerviosa y concentrada entre 100-1000 veces, fenómeno que se conoce con el nombre de recaptación [Elsworth & Roth, 1997]. Dichos transportadores son proteínas sodio-cloro dependientes, de expresión exclusiva en el sistema nervioso central (y retina), y constan de 12 dominios transmembranales [Bannon *et al.*, 2001]. El transportador de dopamina, también llamado DAT, es inhibido por drogas como la cocaína y las amfetaminas [Greenwood *et al.*, 2001] y se le ha relacionado con un amplio espectro de desórdenes psiquiátricos y neurológicos incluyendo la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, adicción a sustancias de abuso o la pérdida de atención debido a hiperactividad [Laakso *et al.*, 2000; 2001].



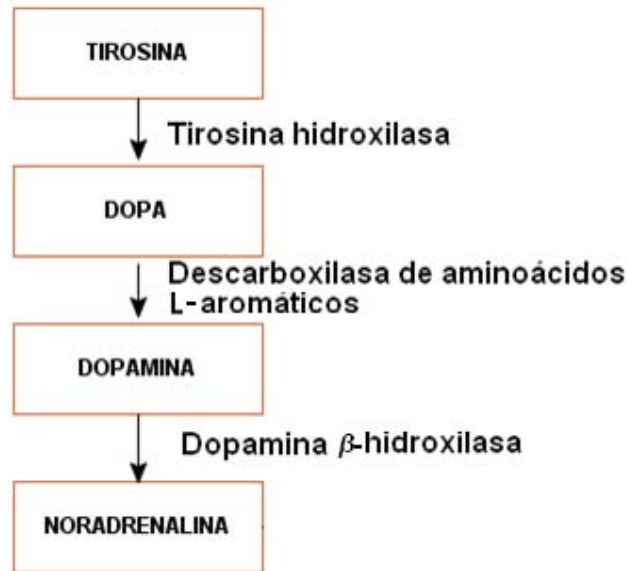


Figura 15. Secuencia en la síntesis de catecolaminas [Nagatsu, 1991].

#### 1.5.2.4 Biotransformación

Otro proceso que ayuda a mantener la homeostasis de la dopamina es su metabolismo. Este proceso se efectúa por dos vías diferentes. En la primera de ellas la dopamina es desaminada oxidativamente y se transforma en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por acción de la monoaminoxidasa (MAO) localizada en la membrana externa mitocondrial. Existen dos isoformas, la A y la B; la isoforma A es la que se encuentra en las neuronas dopaminérgicas y adrenérgicas, mientras que la isoforma B se localiza en células gliales, astrocitos y neuronas serotoninérgicas, siendo la dopamina sustrato de ambas enzimas. Por otro lado, la dopamina también puede ser convertida en 3-metoxitiramina a través de la catecol-o-metiltransferasa (COMT). Cabe señalar sin embargo, que sea cualquiera la vía inicial de su metabolismo al final de el metabolito resultante es el ácido homovanílico [Elsworth & Roth, 1997].

#### 1.6 Extractos y alcaloides de *Annona* con actividad sobre receptores GABAérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, adrenérgicos y otros.

Los extractos de anonas son obtenidos de sus diferentes órganos; como los frutos, las semillas, las hojas, la raíz y la corteza y se les atribuyen propiedades sedativas, hipnóticas y ansiolíticas [Bourne & Egbe, 1979; Gupta, 1995; Hasrat *et al.*, 1997; Caparros-Lefebvre & Elbaz, 1999]. Las referencias fitoquímicas han generado durante las últimas tres décadas interés en diferentes grupos de investigadores en el estudio de estas plantas, con la intención de conocer sus moléculas bioactivas y tratar de esclarecer el o los mecanismos neuronales involucrados en tales efectos.

Los resultados de estas investigaciones han sugerido que algunos metabolitos producidos por estas plantas pudieran ejercer efectos ansiolíticos que implicarían los sistemas de receptores GABAérgicos y serotoninérgicos, así

como acciones sobre el sistema dopaminérgico [Hasrat *et al.*, 1997; Gouemo *et al.*, 1997; Morais *et al.*, 1998; González-Trujano *et al.*, 1998, 2001; López-Rubalcava *et al.*, 2006].

### **1.6.1 Efectos GABAérgicos**

Ha sido reportado que en ratones, los extractos etanólicos de las hojas de la *Annona diversifolia* y *Annona muricata* reducen de manera significativa la incidencia de las convulsiones y la mortalidad inducidas por la inyección de pentilene tetrazol (PTZ) [González-Trujano *et al.*, 1998; Gouemo *et al.*, 1997]. En otros ensayos los extractos de *A. diversifolia*, prolongaron el tiempo de inconciencia en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital y se afectó la coordinación motriz en la pruebas del rodillo rodante y en el nado forzado, indicando un efecto depresor sobre el SNC [González-Trujano *et al.*, 1998]. Estudios posteriores indicaron que la palmitona, una cetona alifática obtenida del extracto de las hojas de esta planta, era la responsable de su efecto anticonvulsivo, además del ansiolítico observado en la prueba del laberinto elevado en forma de "+". Aunque el mecanismo de acción de la palmitona no está esclarecido, se sugiere que en sus efectos el receptor GABA<sub>A</sub> podría estar involucrado [González-Trujano *et al.*, 2001, 2006]. Los estudios de López-Rubalcava y colaboradores (2006) han indicado por otro lado, que el extracto hexánico (EH) de las hojas de *Annona cherimolia* tiene efectos ansiolíticos en dos modelos no condicionados de ansiedad en ratones; en la prueba de la caja luz/oscuridad y en la de enterramiento defensivo. Más aun, dichos autores demostraron que este efecto fue bloqueado en ambas pruebas por la administración de picrotoxina, un antagonista específico de los receptores GABA<sub>A</sub> y fue sinergizado por la administración de muscinol, un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, concluyendo que el efecto ansiolítico del EH de las hojas de *Annona cherimolia* está mediado por la interacción de alguno de sus componentes con el sistema de receptores GABA<sub>A</sub> [López-Rubalcava *et al.*, 2006].

Cabe señalar finalmente que ha sido reportado que la glaucina, un alcaloide bencilisoquinolinico (BIQ), posee un efecto anticonvulsivante en contra de la picrotoxina [Zettler, 1988] que como se señaló antes es un bloqueador de receptores GABA<sub>A</sub>.

### **1.6.2 Efectos serotoninérgicos**

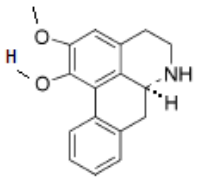
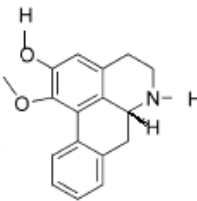
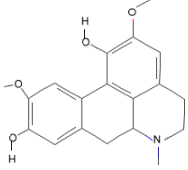
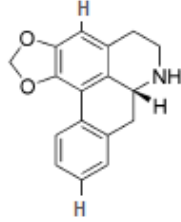
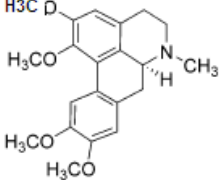
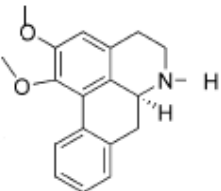
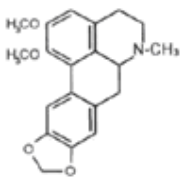
Los alcaloides BIQ se comportan tanto como agonistas ó antagonistas de los receptores serotoninérgicos. La naturaleza de sus efectos parecen depender de las características del esqueleto aporfínico del alcaloide y del subtipo de receptor serotoninérgico con el que interactúan (Cuadros 4 y 5).

En este orden de ideas, la liridinina y la asimilobina, fueron reportadas como antagonistas serotoninérgicos en un estudio realizado en aorta aislada de conejo al inhibir ambos alcaloides la contracción inducida por la serotonina en músculo liso de la arteria [Shoji *et al.*, 1987]. En congruencia con lo anterior, la isoteolina (isoboldina) inhibió en ratones el efecto ansiogénico de la m-clorofenilpiperacina (mCPP), un agonista serotoninérgico de los receptores 5HT<sub>2C</sub>, en el modelo de la caja luz/oscuridad, sugiriendo una actividad

antagonista en estos receptores [Zhelyazkova-Savova, 1998]. Cabe señalar por otro lado que la nanteína otro alcaloide BIQ antagoniza las contracciones inducidas por los agonistas de los receptores 5HT<sub>2</sub> [Alzuela, 1992, citado por Ribeiro & Leite, 2003] y ejerce efecto sedante a bajas dosis, mientras ocasiona ataxia y convulsiones cuando se aumenta la dosis [Ribeiro & Leite, 2003]. Así mismo, la glaucina, antagoniza la contracción inducida por 5HT en la aorta aislada de rata [Catret *et al.*, 1998].

No obstante los efectos señalados antes para la isoteolina también ha sido mostrado que este alcaloide se comporta como agonista sobre los receptores 5HT<sub>1B</sub> en la prueba de déficit de conducta social inducida por aislamiento, pues el alcaloide se comportó en dicha prueba en forma similar a como se comportan los agonistas de los receptores 5HT<sub>1B</sub> [Zhelyazkova-Savova, 2003].

**Cuadro 4. Estructuras de alcaloides BIQ, con actividad en receptores serotoninérgicos**

 <p style="text-align: center;">lirinidina</p>	 <p style="text-align: center;">asimilobina</p>
 <p style="text-align: center;">isoteolina (isoboldina)</p>	 <p style="text-align: center;">anonaina</p>
 <p style="text-align: center;">glaucina</p>	 <p style="text-align: center;">nornuciferina</p>
 <p style="text-align: center;">nantenina</p>	

Cabe señalar, de manera adicional, que los efectos sedantes de los extractos de *Annona muricata* han sido atribuidos a una interacción de tres alcaloides BIQ aislados de esta planta (la anonaina, la nornuciferina y la asimilobina) con receptores serotoninérgicos, pues se encontró que dichos alcaloides, se comportan como agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> de células humanas NIH-3T3 transfectadas con estos receptores. Consistente con los resultados anteriores la anonaina, la nornuciferina y la asimilobina, al igual que los agonistas de los receptores 5HT<sub>1A</sub> modificaron la concentración de AMPc intracelular, determinada por radioinmunoensayo en células NIH-3T3 [Hasrat *et al.*, 1997; Fink & Göthert, 2007]. Con base a lo señalado anteriormente Hasrat (1997), concluye que el efecto agonista en receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> de la anonaina, la nornuciferina y la asimilobina podrían explicar los efectos tranquilizantes de la *Annona muricata* utilizada en la medicina tradicional.

**Cuadro 5. Alcaloides bencilisoquinolinicos con actividad serotoninérgica y antiserotoninérgica**

Alcaloides	5HT <sub>1A</sub>	5HT <sub>2C</sub>	5HT <sub>1B</sub>	5HT
Lirinidina				Antagonista
Asimilobina	Agonista			Antagonista
Isoteolina		Antagonista	Agonista	
Anonaina	Agonista			
Nornuciferina	Agonista			
Nantenina		Antagonista		
Glaucina				Antagonista

### 1.6.3 Efectos dopaminérgicos

En las islas de Guadalupe, pertenecientes a las Antillas francesas, estudios epidemiológicos recientes revelan una alta incidencia de Parkinson atípico resistente a tratamiento con levodopa, incluyendo un síndrome que se parece a una parálisis supranuclear progresiva [Caparros-Lefebvre & Elbaz, 1999]. Más aun, se ha encontrado que en dichas islas existe una posible correlación entre el consumo de *Annona muricata* y *Annona squamosa* y el Parkinson atípico que ahí se observa [Caparros-Lefebvre & Elbaz, 1999; Lannuzel *et al.*, 2002], pues el consumo por las propiedades sedativas e hipnóticas de las frutas y de las infusiones hechas de las hojas, las raíces y la corteza de estas anonas, se encontró significativamente más alto en estos pacientes que en la población general.

Lo señalado, junto con la observación de que algunos de los síntomas de esta patología se detuvieron y estabilizaron en su progresión, y en un caso involucionaron notablemente cuando el consumo de estas plantas se suspendió, apoyan la afirmación que los compuestos presentes en las anonas pudieran causar un síndrome parkinsoniano como resultado de una alteración en la neurotransmisión dopaminérgica [Lannuzel *et al.*, 2002].

La hipótesis anterior fue confirmada en experimentos realizados *in vitro* con neuronas mesencefálicas en cultivo. Dichas células fueron expuestas a un extracto total de alcaloides de *A. muricata* como a dos de los alcaloides

(coreximina y reticulina) con mayor presencia en el extracto, observándose signos de degeneración del 50% de las neuronas dopaminérgicas y algunas GABAérgicas [Lannuzel *et al.*, 2002]. En apoyo de la participación del sistema dopaminérgico en los efectos de los alcaloides provenientes de las anonas cabe señalar que la administración de uno de ellos, la reticulina, a roedores produjo alteraciones conductuales que sugieren una interferencia con el sistema dopaminérgico. Tales alteraciones incluyen la disminución de la coordinación motriz y la hiperactividad inducida por anfetamina así como supresión de la respuesta condicionada de anulación [Morais *et al.*, 1998].

Desde el punto de vista bioquímico cabe señalar que aunque en un estudio de desplazamiento de radioligandos ( $H^3$ -SCH 23390 y  $H^3$ -racloprida) en sinaptosomas aislados del estriado de ratas, se encontró una débil afinidad de la liriodenina por los receptores dopaminérgicos  $D_1$  Y  $D_2$  [Protais *et al.*, 1995]. La liriodenina y la anonaina disminuyeron el contenido de dopamina en células PC12, por inhibición de la actividad de las enzimas HT y la DAA y por inhibición de la liberación de dopamina. Así mismo ambos alcaloides disminuyeron los niveles de  $AMP_c$  y la liriodenina, pero no la anonaina, disminuyó la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular [Jin *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008]. Además la glaucina incrementó los niveles de dopamina y sus metabolitos: el DOPAC y el HVA en células del estriado de cerebro de ratones B6CBA sugiriendo que podría comportarse como un antagonista de receptores dopaminérgicos  $D_2$  presinápticos (autoreceptores) [Asencio *et al.*, 1999; Loghin *et al.*, 2002].

Finalmente, es conocido que las modificaciones estructurales a la predicentrina, obtenida por síntesis a partir de la glaucina incrementan su afinidad por los receptores  $D_1$  [Asencio *et al.*, 2005] y que la nuciferina muestra un perfil de acción asociado al bloqueo de receptores de dopamina, pues ha sido encontrado que la administración de este alcaloide a roedores induce catalepsia, inhibición de la actividad motora espontánea, anulación de la respuesta condicionada, toxicidad por anfetamina y estereotipias [Bhattacharya *et al.*, 1978].

#### **1.6.4 Efectos adrenérgicos**

A diferencia de lo que pasa con el sistema dopaminérgico pocos efectos de los alcaloides de anonas han sido descritos en el sistema adrenérgico. Se sabe sin embargo que la anonaina y la romerina se comportan como antagonistas de los receptores alfa-1 adrenérgicos expresados en fibroblastos de ratas. Ambos alcaloides inhibieron la formación de trifosfato de inositol inducida por noradrenalina en la corteza cerebral y tuvieron actividad vasorelajante en la arteria de la cola de las ratas [Valiente *et al.*, 2004].

La glaucina y la predicentrina, por su lado tuvieron afinidad por los receptores alfa-1<sub>A</sub> adrenérgicos en la corteza cerebral de la rata al competir con la  $^3H$ - prazosina (antagonista de receptores alfa-1<sub>A</sub> adrenérgicos) por su sitio de unión en corteza cerebral [Madrero *et al.*, 1996]. Finalmente, la isocoridina mostró propiedades relajantes en aorta aislada de rata, al inhibir las contracciones inducidas por noradrenalina [Sotníková *et al.*, 1997].

### 1.6.5 Efectos sobre otros receptores

En trabajos clínicos realizados con voluntarios humanos, la glaucina ha demostrado poseer efecto antitusígeno, que además se acompaña de sedación a dosis de 60 mg [Redpath & Pleuvry, 1982]. Más aun, se ha reportado que algunos pacientes han presentado una serie de síntomas que se ha denominado síndrome agudo por glaucina, caracterizado por fatiga, somnolencia, confusión, alteraciones visuales, lo que sugiere una actividad en más de un receptor en el SNC [Rovinskiĭ, 2006].

La glaziovina formó parte de un estudio comparativo con el diazepam. Aunque se determinó que dicho alcaloide poseía efectos ansiolíticos, a diferencia del diazepam no causó astenia ni somnolencia [Bufa *et al.*, 1974]. El alcaloide se comercializó con el nombre de Suavedol.

La reticulina en ratas normotensas a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg; i.v. produjo intensa hipotensión. Esta respuesta hipotensora fue atenuada con la administración de un inhibidor de la sintasa de ON y/o un antagonista muscarínico. En anillos aislados de aorta de rata con endotelio intacto, la reticulina inhibió de manera dosis dependiente las contracciones inducidas por fenilefrina y el cloruro de  $K^+$ ; las contracciones por fenilefrina fueron atenuadas al remover el endotelio vascular o al tratamiento previo con una sintasa de ON. La reticulina antagonizó las contracciones inducidas por cloruro de  $K^+$  y también inhibió el tránsito de  $Ca^{2+}$  intracelular inducido por contracciones por noradrenalina. Estos resultados sugirieron que el efecto hipotensor de la reticulina es probablemente periférico a consecuencia de estimulación muscarínica, activación de la sintasa de ON, bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  y/o inhibición de la liberación de  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares inducida por noradrenalina [Dias *et al.*, 2004].

La nuciferina en estudio realizado mediante el uso de microiontoforesis en medula espinal de gato, deprimió los reflejos monosinápticos de la raíz ventral e inhibió el aumento de la excitabilidad de las motoneuronas inducida por ácido kaínico. Estos hallazgos sugieren que dicho alcaloide podría ser usado como un antagonista de receptores glutamaérgicos [Polc & Haefely, 1977].

De la *Annona purpurea* se han aislado 35 alcaloides sólo 6 de ellos reportados con actividad sobre receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos, muscarínicos y GABAérgicos (Cuadro 1). Sin embargo de la mayoría de ellos, no se conoce si poseen efectos sobre el SNC. Además, algunos alcaloides tienen actividad en más de un receptor, lo que permite inferir que no se ha evaluado de manera sistemática la actividad de estos alcaloides sobre los diversos receptores del SNC. Por lo que se aislaron, purificaron e identificaron dos alcaloides, el primero el de mayor presencia en el extracto alcaloidal total, que correspondió a la annomontina y el segundo la liriodenina, alcaloide que se encuentra presente en la mayoría de los extractos alcaloidales obtenidos de diferentes especies de anonas.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Diagrama General del método

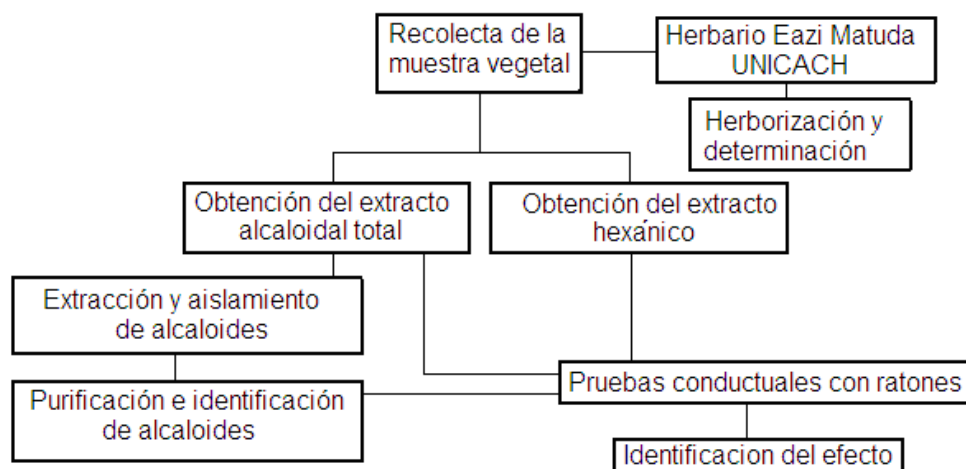


Figura 16. Diagrama general del método

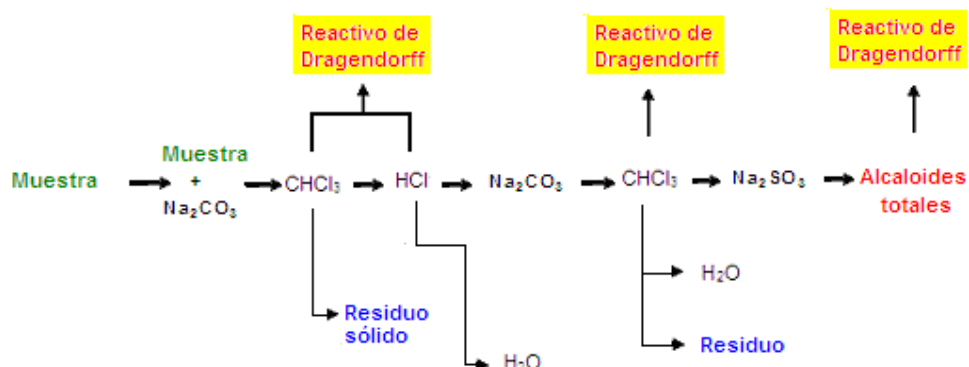
### 2.2 Material

Se recolectaron raíces de *A. purpurea* y *A. diversifolia*, en septiembre de 2005, en Hermenegildo Galeana y en octubre de 2006 en la finca rural “Montaña azul”, municipio de Ocozocoautla, estado de Chiapas, México. Los especímenes se depositaron con el No. 26580 y 30260 en el herbario Eazi Matuda (HEM) de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

### 2.3 Extracción y aislamiento del extracto alcaloidal total

La extracción de alcaloides totales se realizó de acuerdo al procedimiento previamente informado (González-Esquinca, 2001) (Figura 17). Para este propósito, se secaron temperatura ambiente y molieron finamente 2.5 kg de raíces de *Annona purpurea*. El material obtenido se impregnó con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se le permitió secar a temperatura ambiente. Posteriormente el material vegetal fue tratado con 900 mL de  $\text{CHCl}_3$  y agitación continua durante una hora. Este proceso se repitió una vez más, ambas extracciones combinadas fueron filtradas y concentradas a un volumen de 500 mL. El extracto clorofórmico concentrado fue lavado con 500 mL agua destilada 3 veces y extraído dos veces con 2000 mL de HCl 1N en cada ocasión. La fase ácida resultante de ambas extracciones fue alcalinizada a pH 9.5 con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y extraída nuevamente con 1500 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Finalmente, la solución clorofórmica resultante obtenida en esta última extracción fue tratado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y concentrada por evaporación a 45°C y presión reducida. De esta manera se obtuvieron 1.1 g de un extracto de

alcaloides totales. El rendimiento a partir del peso de la raíz seca fue de 0.044%. Todos los pasos fueron monitoreados con el reactivo de Dragendorff.



**Figura 17. Obtención del extracto alcaloidal total.**

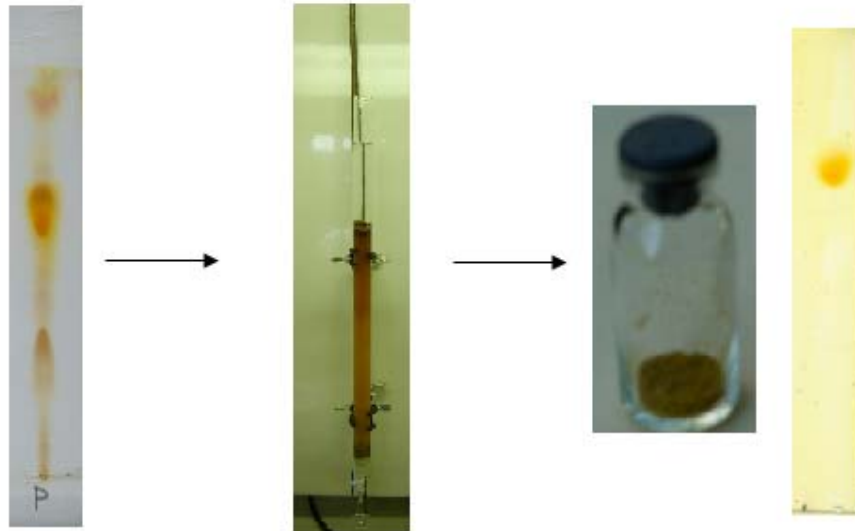
## 2.4 Purificación e identificación de la anomontina

Para la separación de los 1.1 g de alcaloides obtenidos previamente se utilizó una columna cromatográfica de 2 x 40 cm empacada con 67 g de gel de sílice 60 HF<sub>254</sub> (Merck Darmstadt, Germany) (Figura 18) y se eluyó con mezclas de hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol de polaridad ascendente obteniéndose 376 fracciones de 75 mL que fueron monitoreadas por TLC. La composición del eluyente (hexano:acetato de etilo:metanol) y los volúmenes totales obtenidos fueron: 100:0:0 (6750 mL), 90:10:0 (3225 mL), 80:20:0 (1350 mL), 70:30:0 (1725 mL), 60:40:0 (1500 mL), 50:50:0 (1875 mL), 40:60:0 (750 mL), 30:70:0 (1500 mL), 20:80:0 (1500 mL), 10:90:0 (975 mL), 0:100:0 (1800 mL), 0:95:5 (1125 mL), 0:90:10 (1800 mL), 0:80:20 (750 mL), 0:70:30 (300 mL), 0:60:40 (300 mL), 0:50:50 (150 mL), 0:30:70 (150 mL), 0:20:80 (150 mL), 0:10:90 (150 mL), 0:0:100 (150 mL). Por su similitud en TLC las fracciones eluidas con hexano/acetato de etilo (6:4) se reunieron. La evaporación del disolvente permitió la formación de un sólido el cual fue lavado con hexano para obtener 75 mg de un compuesto que fue identificado como anomontina por el Dr. Cortés de la Universidad de Valencia, España.

## 2.5 Extracto hexánico

Se empacaron 100 gr de raíz molida de *A. purpurea* en cartuchos de papel filtro y se extrajeron a reflujo con hexano durante 8 h continuas en un aparato soxhlet. Posteriormente se filtro y el extracto hexánico obtenido se concentró por evaporación a 45°C. Se obtuvo un rendimiento de 0.3216 g.

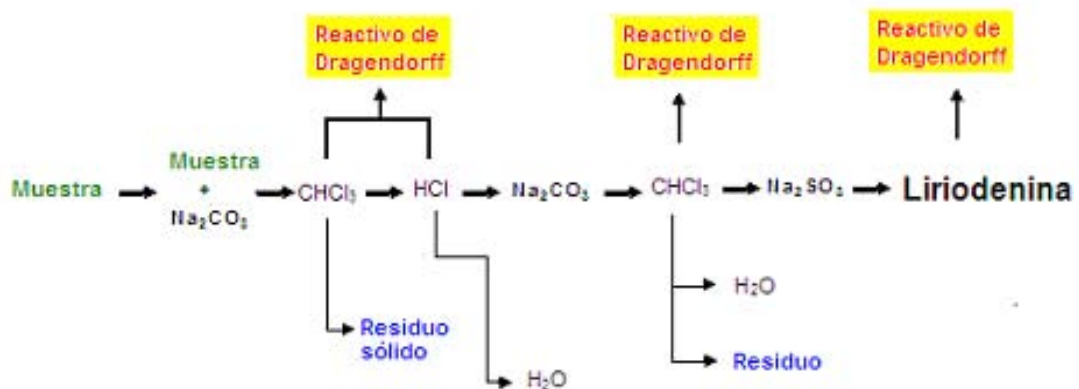




**Figura 18. Aislamiento y purificación de anomontina.** Se observa en la placa cromatografica revelada con reactivo de Dragendorff la presencia de por lo menos cuatro alcaloides (color amarillo y naranja). Para la separación de los alcaloides se utilizó una columna cromatográfica y se eluyó sucesivamente con mezclas de disolventes de polaridad creciente.

### 2.6 Extracción y aislamiento de la liriodenina

La extracción de alcaloides totales se realizó de acuerdo al procedimiento detallado para el aislamiento de anomontina sección 2.3. El extracto clorofórmico fue agitado con movimientos giratorios suaves dentro de un recipiente con agua y hielo, obteniéndose por precipitación cristales amarillos en forma de agujas. El rendimiento obtenido fue de 250 mg de liriodenina. Todos los pasos fueron monitoreados con el reactivo de Dragendorff.



**Figura 19. Extracción y aislamiento de liriodenina.**

## **2.7 Purificación e identificación de la liriodenina**

Los cristales de liriodenina fueron lavados con hexano. La identificación de este alcaloide se logró mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los informados en la literatura (Pérez-Amador *et al.*, 2004).

## **2.8 Animales**

Se utilizaron ratones machos BALB/c de entre 25 a 30 g de peso proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM y en el Bioterio de la UNICAH. Los ratones se hospedaron en grupos de 6 animales en cajas de policarbonato (44/21/21) y fueron mantenidos a una temperatura de 21°C, con ciclos luz-oscuridad de 12:12 h, agua y comida a libre disposición. Los experimentos fueron llevados a cabo en instalaciones de la Facultad de Biología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y en el Lab 204 del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **2.9 Evaluación conductual**

Los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en ausencia del experimentador en un cuarto sono-amortiguado, con la luz y la temperatura controlada y con facilidades para video-grabación. En todos los casos la cámara de video fue colocada por encima de los aparatos de evaluación conductual, con excepción de la prueba de caja luz/oscuridad y la plataforma con orificios en donde la cámara fue colocada en un plano horizontal. Las evaluaciones fueron realizadas entre las 10:00 – 14:00 h. Todos los dispositivos usados para las pruebas conductuales fueron lavados con detergente al finalizar cada evaluación individual. Tanto los grupos control como los experimentales fueron formados por ratones escogidos al azar. La administración de los compuestos fue también realizada de la misma manera por un observador quien no conocía las condiciones experimentales utilizadas.

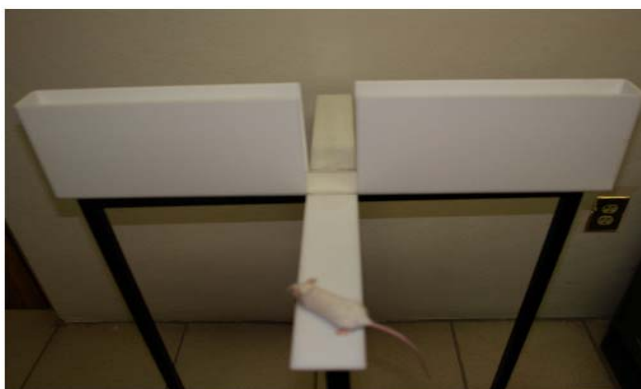
## **2.10 Fármacos**

Los extractos de hexano y alcaloides totales de *A. purpurea*, annomontina, liriodenina, ondansetrón (Sandoz Farmacéutica, México), diazepam (Hoffmann-La Roche, México), sulfato de anfetamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y haloperidol (Haldol Jansen-Cilag, S.A. de C.V, Ciudad de México, México) fueron disueltos en una mezcla de polietilenglicol 400 + ácido cítrico (4g/5mg) en 10 mL de H<sub>2</sub>O, el pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fue disuelto en una solución de cloruro de sodio a 0.9%. Todos los compuestos utilizados en este estudio fueron inyectados por la vía intraperitoneal (i.p.) usando un volumen por dosis de 10 mL/kg. Los animales del grupo control recibieron una cantidad igual del vehículo. Para cada experimento se utilizaron grupos de 5 a 7 ratones.

## **2.11 Evaluación de la ansiedad**

### **2.11.1 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”**

Se utilizó un laberinto en forma de signo “+” que poseía dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (15 x 5 cm) que se intersectaban en un cuadrado central (5 x 5 cm). El laberinto fue colocado mediante un pedestal a 38.5 cm del piso (Figura 20) [Rodgers, 1997]. La prueba se inició colocando al ratón en la plataforma central del laberinto con dirección hacia alguno de sus brazos abiertos, cuantificándose durante 5 minutos el tiempo que el ratón permaneció en ellos así como el número de entradas a cada tipo de brazos. El porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos, se calculó para cada animal de la siguiente manera:  $100 \times \text{tiempo en los brazos abiertos} / \text{total tiempo de la prueba}$  [Grundmann *et al.*, 2006].



**Figura 20. Laberinto elevado en cruz**

### **2.11.2 Prueba de la caja luz/oscuridad**

En este método se usó una cámara de propileno de 44 x 21 x 21 cm oscurecida con pintura negra depositada sobre un tercio de su superficie. La cámara poseía una abertura de 13 x 5 cm que separaba la zona oscurecida de la zona sin pintar, la cual se iluminó intensamente con una lámpara fluorescente de 22 w (Figura 21). Al comienzo de la prueba el animal fue colocado en el lado iluminado de la caja y se observó su conducta, registrándola en un periodo de 10 minutos. Durante este período se cuantificó tanto el número de transiciones (las veces que el ratón ingresaba al lado oscuro y regresaba al área iluminada de la cámara) como el tiempo de permanencia en cada uno de los compartimentos de la cámara [Crawley & Goodwin, 1980].



**Figura 21. Caja luz/oscuridad**

### **2.11.3 Prueba de enterramiento de canicas**

La prueba consistió en colocar al ratón en una caja (se utilizó la de campo abierto) con el piso cubierto de aserrín (5 cm), sobre el cual se distribuyeron uniformemente 25 canicas de vidrio (16 mm de diámetro) (Figura 22). Durante la prueba, se contabilizó el número de canicas que el ratón enterró en el aserrín durante un periodo de 30 minutos [Ichimaru *et al.*, 1995]. La actividad locomotriz del animal se evaluó simultáneamente a través del video tape de la prueba de enterramiento de canicas, cuadrículando el monitor y cuantificando el número de líneas cruzadas por el animal durante los 30 min de la prueba.



**Figura 22. Enterramiento de canicas**

### **2.11.4 Prueba de la plataforma con orificios**

Para esta prueba se utilizó una plataforma de perspex gris (40 x 40 cm y 2.2 cm de espesor) que poseía 16 orificios de 3 cm de diámetro, distribuidos equidistantemente sobre su superficie. La plataforma fue puesta sobre un soporte a una altura de 15 cm del suelo (Figura 23) [File & Pellos, 1985; Takeda *et al.*, 1998]. El ensayo se realizó colocando al animal en el centro de la plataforma y registrando durante 5 minutos el número de veces que el animal exploraba los orificios. Solo aquellas exploraciones en las que el ratón introdujo la cabeza dentro de los orificios hasta el nivel de las orejas fueron consideradas como positivas.

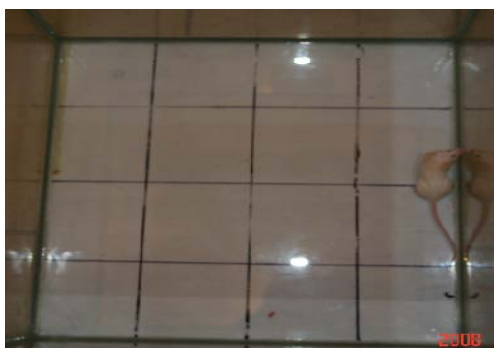


**Figura 23. Plataforma con orificios**

## **2.12 Evaluación de la integridad locomotriz**

### **2.12.1 Prueba de campo abierto**

La prueba se realizó en una caja de vidrio (con paredes y piso transparente de 48 x 48 x 30 cm) cuyo piso se dividió con líneas pintadas de color negro formando cuadros de 12 x 12 cm (Figura 24) y se iluminó con un foco de luz roja de 15 w. La prueba tuvo una duración de 5 minutos durante los cuales se evaluaron la distancia total recorrida (número de líneas cruzadas marcadas en el piso, considerada como la actividad locomotriz horizontal) y los enderezamientos (número de veces en que el ratón se extendió apoyando sus patas delanteras en las paredes de la caja, representando la actividad locomotriz vertical) [Silvania *et al.*, 2004].



**Figura 24. Campo abierto**

### **2.12.2 Prueba del rodillo rodante**

La integridad de la coordinación motriz se valoró con el aparato del rodillo rodante. Los ratones fueron previamente entrenados a permanecer en el rodillo rodante (3 cm de diámetro), rotando a una velocidad de 8 rpm (Figura 25), durante 3 min. Durante la prueba los animales se colocaron en el rodillo

rodante y se contó el número de caídas que el ratón experimento durante ella [Sugimoto *et al.*, 2008].

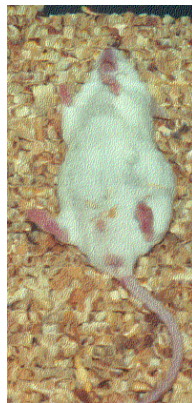


**Figura 25. Rodillo rodante**

## **2.13 Evaluación de sedación**

### **2.13.1 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital**

El efecto sedativo potencial de las sustancias en estudio se evaluó a través de sus efectos sobre las acciones hipnóticas del pentobarbital. El pentobarbital (42 mg/kg, i.p.) se administró 30 min después de la inyección de las sustancias bajo escrutinio. Durante la prueba se estudió tanto la latencia, considerada como el tiempo transcurrido desde la administración del pentobarbital a la pérdida del reflejo de enderezamiento, como la duración de la hipnosis, evaluado como el tiempo que transcurre desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de enderezamiento (Figura 26) [González-Trujano *et al.*, 2001].



**Figura 26. Hipnosis inducida por pentobarbital**

## **2.14 Evaluación de la actividad antidopaminérgica**

### **2.14.1 Prueba de la barra**

En esta prueba, las patas delanteras de los ratones fueron posadas con gentileza sobre una barra horizontal de metal con un diámetro de 2 mm que se encontraba a 4 cm sobre el nivel del suelo. Durante el procedimiento se midió el lapso de tiempo que el ratón pudo mantener esta postura anormal (Figura 27). La prueba fue dada por terminada cuando alguna de las patas del animal tocaba el suelo. Si el animal no se aferraba a la barra después de tres intentos, recibía una calificación de 0 segundos y era regresado a su caja. La misma observación se efectuó a los 5, 10 y 15 min después de la administración del alcaloide. Para cada período fueron utilizados grupos de 5 ratones, no expuestos previamente a la prueba para evitar la “pseudocatalepsia” o catalepsia aprendida [Ferre *et al.*, 1990]. Como control positivo se utilizó al haloperidol [Pergentino *et al.*, 2005]



**Figura 27. Prueba de la barra**

### **2.14.2 Hiperactividad inducida por anfetamina**

Para esta prueba, la actividad locomotriz del ratón en la prueba del campo abierto fue registrada durante 30 min después de la administración de liriodenina (1, 10 y 20 mg/kg), haloperidol (5 mg/kg) o vehículo. Al fin de este período los animales recibieron sulfato de anfetamina (3 mg/kg) e inmediatamente fueron regresados al campo abierto en donde se evaluó por una hora más su actividad locomotriz (Figura 28) [Morais *et al.*, 1998].



**Figura 28. Hiperactividad inducida por anfetamina**

### **2.15 Toxicidad**

Se administraron diferentes dosis de los extractos y/o alcaloides por vía i.p. y la mortalidad de los ratones se registró por 48 h [Morais *et al.*, 1998].

### **2.16 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron evaluados usando la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba post-hoc de Newman-Keuls para comparaciones múltiples cuando fue requerido. Para las pruebas de la barra y de hiperactividad inducida por anfetamina se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM de 5-7 ratones por grupo. Un valor de alfa de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los parámetros estadísticos fueron procesados usando el paquete estadístico GraphPad Prism (versión 4).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efectos conductuales de los extractos alcaloidal total y hexánico obtenidos de la raíz de la *Annona purpurea* MOC. & SESSE

##### 3.1.1 Extracto alcaloidal total

###### 3.1.1.1 Toxicidad

Con dosis de 3.12, 12.5, 25 y 50 mg/kg del extracto alcaloidal total (i.p.) no se registró ninguna muerte en un período de observación de 48 h después de su administración.

###### 3.1.1.2 Prueba de campo abierto

No se observaron diferencias significativas tanto en el número de líneas cruzadas ( $F_{4,25}=1.314$ ;  $P > 0.05$ ) como en el número de enderezamientos ( $F_{4,25}=1.017$ ;  $P > 0.05$ ) entre los ratones tratados (3.12, 12.5, 25 y 50 mg/kg) y aquellos a los que solo se les administró el vehículo (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Efectos de la administración del extracto alcaloidal total sobre la locomoción del ratón en la prueba de campo abierto. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM; N = 6 para cada grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p	Número líneas cruzadas	Número de enderezamientos
Vehículo	92.8 $\pm$ 11.3	17.1 $\pm$ 5.4
3.12.	129.1 $\pm$ 18.1	26.6 $\pm$ 5.8
12.5	81.1 $\pm$ 21.2	17.5 $\pm$ 6.8
25.	73.1 $\pm$ 17.5	11.1 $\pm$ 4.4
50	82.8 $\pm$ 25.0	11.8 $\pm$ 7.6

###### 3.1.1.3 Prueba del rodillo rodante

Ninguna de las dosis del extracto alcaloidal total (3.12, 12.5, 25 y 50 mg/kg) indujo cambios ( $F_{4,25}=0.4167$ ;  $P > 0.05$ ) en el número de caídas de los animales del rodillo en comparación con el grupo control (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Efecto de la administración del extracto alcaloidal total sobre la coordinación motora de el ratón en la prueba del rodillo rodante. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM; N = 6 para cada grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Número promedio de caídas
Vehículo	0.1 $\pm$ 0.1
3.12	0.6 $\pm$ 0.3
12.5	1.0 $\pm$ 1.0
25	1.0 $\pm$ 0.6
50	1.0 $\pm$ 0.6

### 3.1.1.4 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital

La dosis de 25 mg/kg del extracto alcaloidal total prolongó el tiempo de hipnosis inducida por pentobarbital ( $F_{3,16}=3.321$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 29), pero no tuvo efectos sobre su latencia ( $F_{3,16}=0.4067$ ;  $P > 0.05$ ).

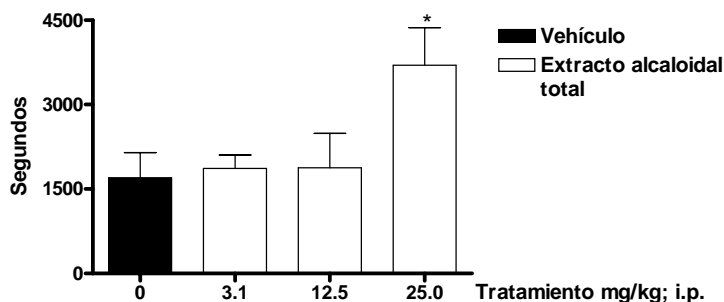


Figura 29. Efecto del extracto alcaloidal total sobre el tiempo de hipnosis en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. El extracto alcaloidal total incrementó la duración de la hipnosis. \* $P < 0.05$  comparado con el grupo del vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5$  por cada grupo

### 3.1.1.5 Laberinto elevado en forma de “+”

No se observaron diferencias significativas a ninguna de las dosis del extracto alcaloidal utilizadas (3.12, 12.5, 25 y 50 mg/kg) tanto en el número de entradas ( $F_{4,25}= 0.4495$ ;  $P > 0.05$ ) como en el tiempo de permanencia (%) de los animales en los brazos abiertos del laberinto (Cuadro 8) ( $F_{4,25}= 0.5517$ ;  $P > 0.05$ ) en comparación con aquellos a los que solo se les administró el vehículo.

Cuadro 8. Efectos del extracto alcaloidal total en la prueba del laberinto elevado en forma de “+”. Se representa la media  $\pm$  SEM.  $N = 6$  ratones por grupo

Tratamiento mg/kg; i.p.	Entradas a los brazos abiertos	Permanencia en los brazos abiertos (%)
Vehículo	11,33 $\pm$ 1,453	34,35 $\pm$ 6,561
3.12	11,33 $\pm$ 2,616	49,42 $\pm$ 13,18
12.5	8,333 $\pm$ 2,917	50,42 $\pm$ 16,88
25	8,000 $\pm$ 2,449	44,37 $\pm$ 14,67
50	10,67 $\pm$ 2,539	62,30 $\pm$ 14,69

### 3.1.2 Extracto hexánico

#### 3.1.2.1 Toxicidad

La  $DL_1$  (dosis a la que se presenta la muerte del primer ratón) se presentó tras la administración de 25 mg/kg del extracto hexánico, la  $DL_{50}$  se observó con 50 mg/kg (Figura 30).

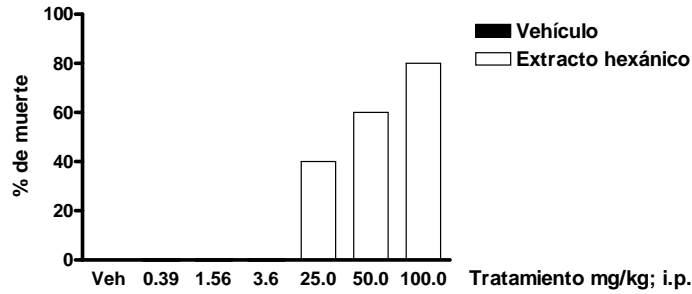


Figura 30. Porcentaje de animales muertos en 48 hrs en la prueba de toxicidad aguda con el extracto hexánico. N= 5 ratones por cada grupo

### 3.1.2.2 Prueba de campo abierto

Con el extracto hexánico se observaron diferencias significativas tanto en el número de líneas cruzadas (Figura 31) ( $F_{5,33}=5.358$ ;  $P < 0.05$ ) como en el número de enderezamientos (Figura 32) ( $F_{5,33}=4.893$ ;  $P < 0.05$ ) entre los ratones tratados (12.5 y 25 mg/kg) y aquellos a los que solo se les administró el vehículo.

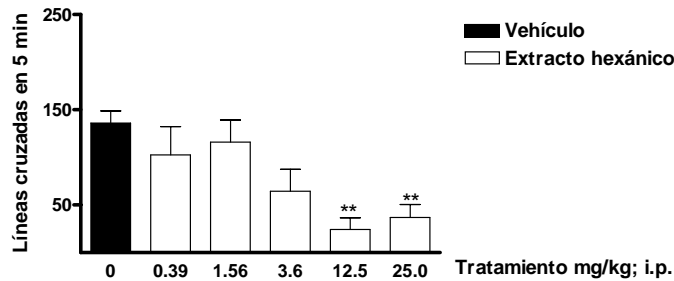


Figura 31. Efectos del extracto hexánico sobre la actividad locomotriz horizontal en la prueba de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico disminuyó la actividad locomotriz en comparación al grupo control. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. N= 5-7 ratones por grupo

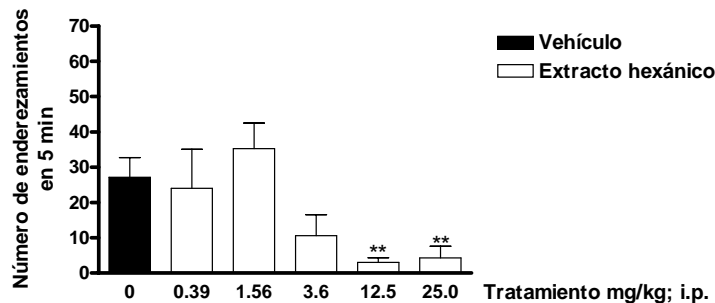
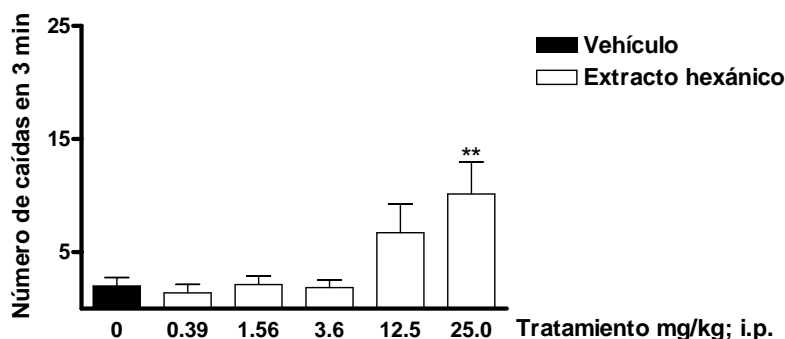


Figura 32. Efectos del extracto hexánico sobre la actividad locomotriz vertical en la prueba de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico disminuyó el número de enderezamientos, representando la actividad locomotriz vertical. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. N= 5-7 ratones por grupo

### 3.1.2.3 Prueba del rodillo rodante

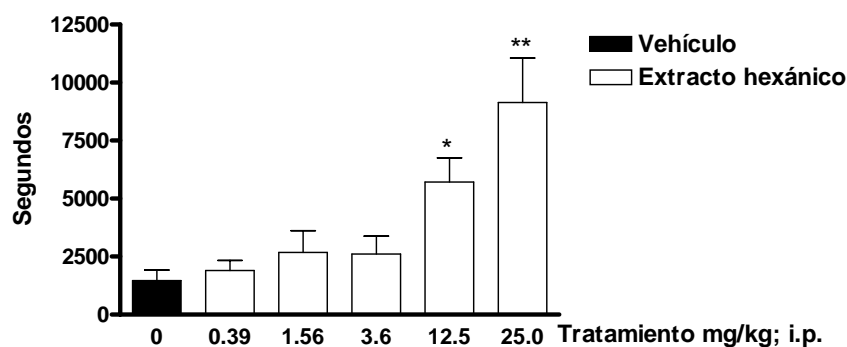
El extracto hexánico (25 mg/kg) indujo cambios significativos ( $F_{5,34} = 4.293$ ;  $P < 0.05$ ) en el número de caídas de los animales del rodillo utilizado en esta prueba cuando los resultados fueron comparados con el grupo control (Figura 33).



**Figura 33.** Efecto del extracto hexánico sobre la coordinación motora de el ratón en la prueba del rodillo rodante. Se representa la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico aumentó el número de caídas, indicando pérdida de la coordinación motriz. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-7$  ratones por grupo

### 3.1.2.4 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital

A la dosis de 12.5 y 25 mg/kg el extracto hexánico prolongó el tiempo de hipnosis inducida por pentobarbital ( $F_{5,29} = 7.636$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 34). Su administración no tuvo efectos sobre el periodo de latencia ( $F_{5,29} = 0.4067$ ;  $P > 0.05$ ).



**Figura 34.** Efecto del extracto hexánico sobre el tiempo de hipnosis en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. El extracto hexánico incrementó la duración de la hipnosis. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  comparado con el grupo del vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-6$  por cada grupo

### 3.1.2.5 Laberinto elevado en forma de “+”

En el laberinto elevado en forma de “+” la administración del extracto hexánico (0.39, 1.56, 3.6, 12.5, 25 mg/kg), fue incapaz de provocar cambios significativos tanto en el número de entradas ( $F_{5,33} = 1.629$ ;  $P > 0.05$ ) a los brazos abiertos del laberinto como en el tiempo de permanencia (%) en ellos (Cuadro 9) ( $F_{5,33} = 0.7963$ ;  $P > 0.05$ ) con relación a la conducta observada en los animales tratados con el vehículo.

**Cuadro 9. Efectos del extracto hexánico en la prueba del laberinto elevado en forma de “+”. Se representa la media  $\pm$  SEM. N= 5-7 ratones por grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Entradas a los brazos abiertos	Permanencia en los brazos abiertos (%)
Vehículo	4,333 $\pm$ 1,476	22,53 $\pm$ 8,578
0.39	10,20 $\pm$ 4,042	53,30 $\pm$ 14,02
1.56	8,000 $\pm$ 2,828	34,80 $\pm$ 11,39
3.6	3,429 $\pm$ 1,288	38,94 $\pm$ 14,73
12.5	3,429 $\pm$ 1,716	48,59 $\pm$ 17,07
25.0	3,571 $\pm$ 1,360	24,69 $\pm$ 24,69

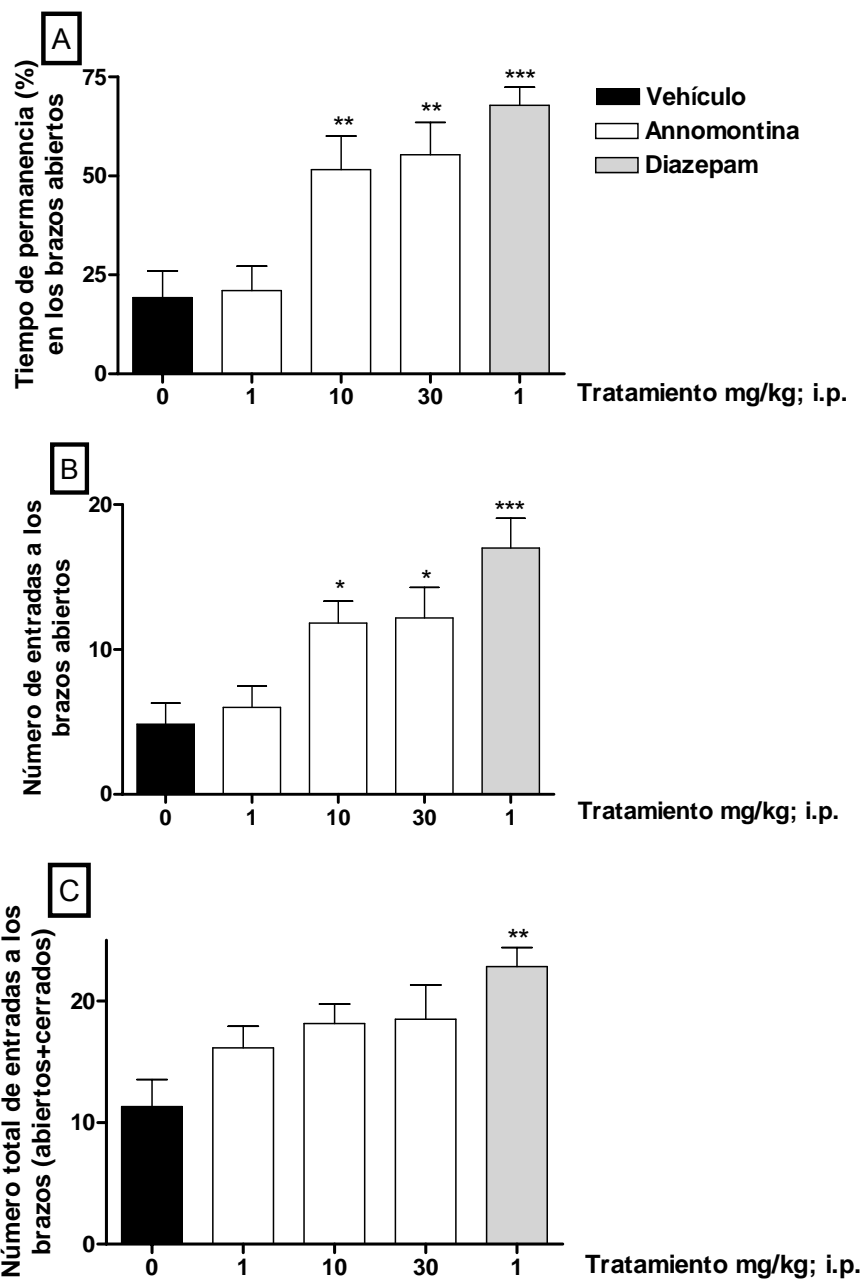
### 3.2 Efectos conductuales de la annomontina

#### 5.2.1 Toxicidad

La mortalidad provocada por la annomontina a las 48 horas de su administración fue nula cuando el alcaloide fue administrado a dosis de 1, 10 y 30 mg/kg y la sobrevivencia de los ratones fue seguida por 48 h después de su administración (Morais, 1998).

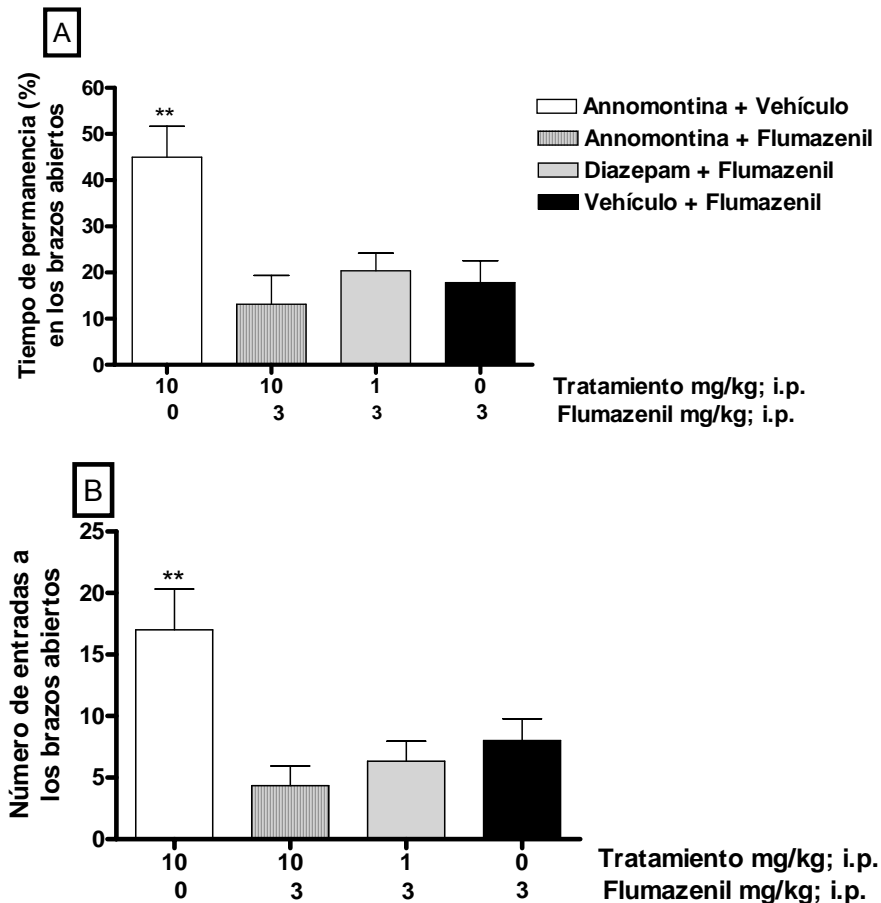
#### 3.2.2 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”

La annomontina a las dosis de 10 y 30 mg/kg al igual que el diazepam (1mg/kg) incrementó tanto el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto ( $F_{4,25} = 9.679$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 35 A), como el número de entradas a ellos ( $F_{4,25} = 8.033$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 35 B) sin afectar el número total de entradas a los brazos (abiertos + cerrados) de el laberinto. El diazepam incrementó significativamente este último parámetro ( $F_{4,25} = 4.150$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 35 C).



**Figura 35.** Efectos de la annomontina sobre la conducta del ratón en la prueba del laberinto elevado en forma de “+”. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. La annomontina y el diazepam, usado como control positivo en esta prueba, incrementaron: (A) el tiempo de permanencia y (B) el número de entradas a los brazos abiertos de esta prueba. La annomontina a diferencia del diazepam no tuvo efectos en el número total de entradas a los brazos (abiertos + cerrados) del laberinto (C). El diazepam incrementó significativamente este último parámetro comparado con el grupo control, pero no presentó diferencias cuando se comparó con los grupos tratados con annomontina. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  comparados al grupo del vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 6$  por grupo

La inyección de flumazenil (3 mg/kg) 15 min antes de la administración de annomontina (10 mg/kg), antagonizó los efectos de este alcaloide sobre el tiempo de permanencia ( $F_{3,20} = 6.725$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 36A) y el número de entradas ( $F_{3,20} = 6.444$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 36B) de los ratones a los brazos abiertos del laberinto.



**Figura 36. Efectos del flumazenil sobre la actividad de la annomontina en la conducta del ratón en la prueba del laberinto elevado en forma de “+”. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. El flumazenil administrado 15 min antes de la annomontina, suprimió completamente los efectos de la annomontina sobre: (A) en el tiempo de permanencia y (B) en el número de entradas a los brazos abiertos del laberinto. Resultados no significativos fueron encontrados entre los grupos de annomontina + flumazenil en comparación con diazepam + flumazenil sobre estos parámetros.  $**P < 0.01$  versus annomontina + vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 6$  por grupo**

### 3.2.3 Prueba de campo abierto

No se observaron diferencias significativas en el número de líneas cruzadas ( $F_{4,25} = 0.2249$ ;  $P > 0.05$ ) por los ratones y en el número de enderezamientos ( $F_{4,25} = 0.7309$ ;  $P > 0.05$ ) observados en esta prueba entre los grupos tratados con annomontina (1 – 30 mg/kg) y los tratados con vehículo y diazepam (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Efectos de la administración de annomontina sobre la locomoción del ratón en la prueba de campo abierto. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SME; N = 6 para cada grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Número de líneas cruzadas	Número de enderezamientos
Vehículo	61.0 $\pm$ 5.3	14.1 $\pm$ 4.2
1	55.1 $\pm$ 10.2	12.0 $\pm$ 5.2
10	74.1 $\pm$ 30.6	13.5 $\pm$ 5.3
30	60.5 $\pm$ 13.6	12.3 $\pm$ 4.5
Diazepam 1	76.0 $\pm$ 24.7	6.8 $\pm$ 2.7

### 3.2.4 Prueba del rodillo rodante

La annomontina (1 – 30 mg/kg) no ocasionó cambios en el número de caídas del dispositivo usado ( $F_{4,25} = 1.469$ ;  $P > 0.05$ ) en relación a las observadas en los grupos tratados con el vehículo y diazepam (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Efecto de la annomontina sobre la coordinación motora del ratón en la prueba del rodillo rodante. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM; N = 6 para cada grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Número promedio de caídas
Vehículo	0.833 $\pm$ 0.307
1	0.333 $\pm$ 0.211
10	1.500 $\pm$ 0.500
30	1.000 $\pm$ 0.365
Diazepam 1	0.600 $\pm$ 0.342

### 3.2.5 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital

La annomontina (1 – 30 mg/kg) no modificó la latencia ( $F_{4,25} = 1.999$ ;  $P > 0.05$ ), a la pérdida del reflejo de enderezamiento ni el tiempo de hipnosis ( $F_{4,25} = 5.522$ ;  $P > 0.05$ ) medido como el lapso de tiempo existente entre el inicio de la pérdida a la recuperación del reflejo de enderezamiento. En contraste el diazepam (1 mg/kg), incremento significativamente este último parámetro ( $F_{4,25} = 5.522$ ;  $P < 0.05$ ), pero no tuvo efecto sobre la latencia ( $F_{4,25} = 1.999$ ;  $P > 0.05$ ) (Cuadro 12).



**Cuadro 12. Efecto de la administración de annomontina en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Latencia (min)	Tiempo de sueño (min)
Vehículo	3.4 ± 1.0	198.2 ± 25.9
1	2.5 ± 0.7	200.0 ± 27.5
10	5.0 ± 1.0	182.2 ± 22.1
30	3.4 ± 0.9	232.7 ± 18.1
Diazepam 1	2.2 ± 0.4	300.8 ± 11.6*

Los resultados son expresados como la media ± SEM. Los ratones fueron tratados con pentobarbital (42 mg/kg) y 30 min después los efectos de estas sustancias sobre el tiempo de hipnosis fue observado. \*P < 0.05, en comparación al grupo del vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. N = 6 para cada grupo

### 3.3 Efectos conductuales de la liriodenina

#### 3.3.1 Toxicidad

Diferentes dosis de la liriodenina (1, 5, 7.5, 10, 20 y 30 mg/kg) fueron administradas a ratones y su mortalidad registrada por 48 h (Morais, 1998). No se registraron muertes en las 48 h subsecuentes a la administración de las distintas dosis del alcaloide.

#### 3.3.2 Prueba del laberinto elevado en forma de “+”

La liriodenina a dosis de 1.2, 2.5, 5 y 10 mg/kg no tuvo efectos sobre el número de entradas a los brazos abiertos ( $F_{6,35} = 0.7970$ ;  $P > 0.05$ ) y el tiempo de permanencia en ellos ( $F_{6,35} = 1.326$ ;  $P > 0.05$ ) (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Efectos de la liriodenina en la prueba del laberinto elevado en forma de “+”. Se representa la media ± SEM. N= 6 ratones por grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Número de entradas a los brazos abiertos	Permanencia (segundos) en los brazos abiertos
Vehículo	13.00 ± 1.983	123.3 ± 30.25
Ondansetron 0.05	12.17 ± 1.905	128.0 ± 24.33
1.2	6.833 ± 2.182	59.83 ± 20.55
2.5	11.67 ± 3.073	102.5 ± 22.47
5	11.33 ± 3.018	81.50 ± 20.65
10	9.833 ± 1.778	97.17 ± 24.06

#### 3.3.3 Prueba de la caja luz/oscuridad

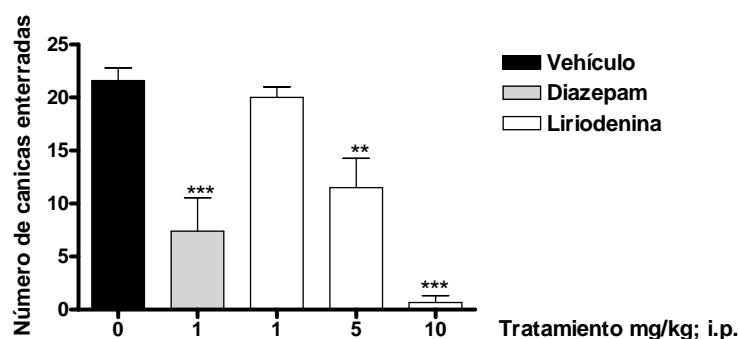
La liriodenina a dosis de 0.6, 1.2, 2.5 y 5 mg/kg no modificó la conducta de los ratones en esta prueba, evaluada a través de cuantificar el número de transiciones entre ambos compartimentos ( $F_{4,25} = 1.478$ ;  $P > 0.05$ ), el tiempo de permanencia en el lado iluminado de la caja ( $F_{4,25} = 1.083$ ;  $P > 0.05$ ), y la latencia a pasar del espacio iluminado al espacio oscuro de la prueba ( $F_{4,25} = 0.7370$ ;  $P > 0.05$ ) (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Efectos de la liriodenina en la prueba de la caja luz/oscuridad. Se representa la media  $\pm$  SEM. N= 6 ratones por grupo.**

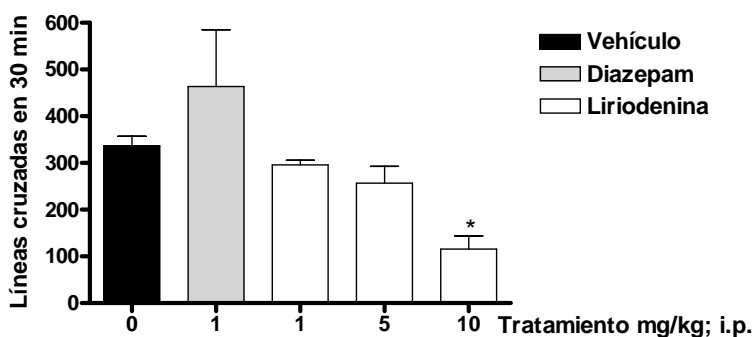
Tratamiento mg/kg; i.p.	Latencia	Número de transiciones al espacio iluminado	Permanencia (segundos) en el espacio iluminado
Vehículo	105.2 $\pm$ 73.19	16.83 $\pm$ 0.9804	291.7 $\pm$ 26.03
0.6	52.17 $\pm$ 15.46	17.67 $\pm$ 1.994	272.7 $\pm$ 35.90
1.2	56.67 $\pm$ 15.50	22.17 $\pm$ 2.442	312.0 $\pm$ 33.97
2.5	24.83 $\pm$ 7.021	17.33 $\pm$ 1.406	253.2 $\pm$ 19.82
5	83.00 $\pm$ 23.05	18.50 $\pm$ 1.607	323.7 $\pm$ 16.40

### 3.3.4 Prueba de enterramiento de canicas

La liriodenina a dosis de 5 y 10 mg/kg al igual que el diazepam (1 mg/kg) incrementó el número de canicas enterradas en la prueba en comparación con lo observado en el grupo control (Figura 37) ( $F_{4,23} = 19.76$ ;  $P < 0.05$ ). Adicionalmente, el alcaloide a dosis de 10 mg/kg, a diferencia del diazepam (1 mg/kg) que no tuvo efectos significativos, disminuyó la actividad locomotriz de los animales medida en la caja utilizada para esta prueba (Figura 38) ( $F_{4,23} = 5.435$ ;  $P < 0.05$ ).



**Figura 37. Efecto de la liriodenina sobre el número de canicas enterradas en la prueba de enterramiento de canicas. Se representa la media  $\pm$  SEM. La liriodenina al igual que el diazepam, disminuyeron la conducta de enterramiento en comparación al grupo control. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. N= 5-6 ratones por grupo**



**Figura 38. Efecto de la liriodenina sobre la actividad locomotriz en la prueba de enterramiento de canicas. Se representa la media  $\pm$  SEM. La liriodenina disminuyó la actividad locomotriz en comparación al grupo control. \* $P < 0.05$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-7$  ratones por grupo**

### 3.3.5 Prueba de la plataforma con orificios

La liriodenina a diferencia del ondansetron y el diazepam ( $F_{5,27} = 5.8861.478$ ;  $P < 0.05$ ) que incrementaron estadísticamente el número de exploraciones a los orificios, no tuvo efecto sobre este parámetro. Ninguno de los compuestos administrados tuvo efecto sobre la actividad locomotora medida en la misma prueba ( $F_{5,27} = 1.500$ ;  $P > 0.05$ ) (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Efectos de la liriodenina en la prueba de la plataforma agujereada. Se representa la media  $\pm$  SEM.  $N = 6$  ratones por grupo**

Tratamiento mg/kg; i.p.	Número de exploraciones	Actividad locomotriz
Vehículo	23.80 $\pm$ 1.497	36.40 $\pm$ 13.19
Ondansetrón 0.01	36.60 $\pm$ 2.293*	51.00 $\pm$ 6.427
Diazepam 1	2.293 $\pm$ 4.155*	6.427 $\pm$ 10.87
0.1	15.67 $\pm$ 2.667	19.40 $\pm$ 9.740
1	22.50 $\pm$ 22.50	54.83 $\pm$ 9.418
10	29.50 $\pm$ 3.862	56.50 $\pm$ 15.13

**$P^* < 0.05$  comparada contra el vehículo. ANOVA de una vía, seguida por la postprueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples**

### 3.3.6 Prueba de campo abierto

Se observaron diferencias significativas tanto en el número de líneas cruzadas (Figura 39) ( $F_{8,48} = 4.107$ ;  $P < 0.05$ ) como en el número de enderezamientos (Figura 40) ( $F_{8,48} = 4.893$ ;  $P < 0.05$ ) entre los ratones tratados con liriodenina (15, 20 y 25 mg/kg) y aquellos a los que solo se les administró el vehículo. La administración de diazepam no tuvo efecto sobre la locomoción horizontal (Figura 39) pero al igual que la liriodenina disminuyó el número de enderezamientos (Figura 40).

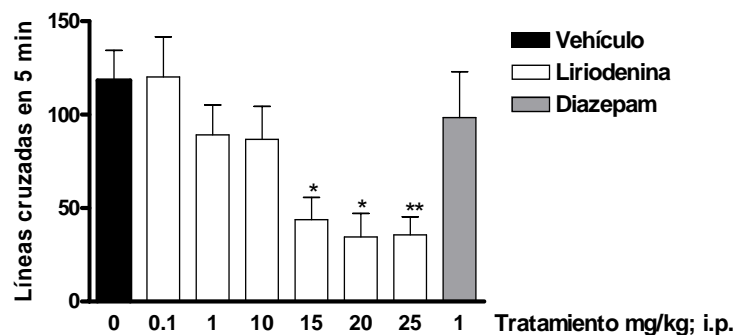


Figura 39. Efecto de la liriodenina sobre la actividad locomotriz horizontal en la prueba de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  SEM. La liriodenina disminuyó la actividad locomotriz en comparación al grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-7$  ratones por grupo

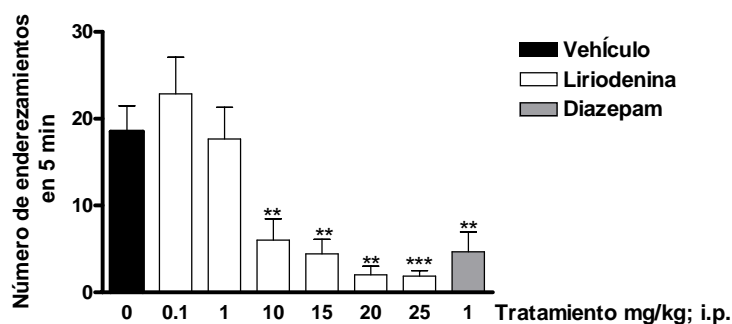


Figura 40. Efecto de la liriodenina sobre la actividad locomotriz vertical en la prueba de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  SEM. La liriodenina y el diazepam utilizado como control positivo, disminuyeron el número de enderezamientos, representando la actividad locomotriz vertical. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  comparados contra el vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N = 5-7$  ratones por grupo

### 3.3.7 Prueba del rodillo rodante

La liriodenina incrementó el número de caídas con diferencias significativas respecto al grupo control ( $F_{5,30} = 2.638$ ;  $P < 0.05$ ) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Efecto de la liriodenina sobre el número de caídas en la prueba del rodillo rodante. Se representa la media  $\pm$  SEM.  $N = 6$  ratones por grupo

Tratamiento mg/kg; i.p.	Número de caídas
Vehículo	0 $\pm$ 0
0.1	0 $\pm$ 0
1	0.167 $\pm$ 0.167
10	1.667 $\pm$ 1.116
20	4.333 $\pm$ 2.171*
Diazepam 1	1.750 $\pm$ 0.854

\* $P < 0,05$  comparada contra el vehículo. ANOVA de una vía, seguida por la postprueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples

### 3.3.8 Prueba de hipnosis inducida por pentobarbital

La lirioidenina aunque prolongó significativamente el tiempo de hipnosis, cuantificado entre el lapso de tiempo entre la pérdida y recuperación del reflejo del enderezamiento ( $F_{3,18}=10.47$ ;  $P < 0.05$ ) (Figura 41); no tuvo ningún efecto en la latencia a la pérdida del reflejo de enderezamiento ( $F_{3,18}= 0.8098$ ;  $P > 0.05$ ).

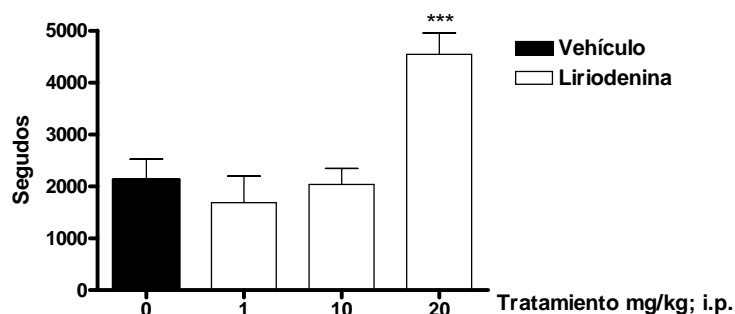


Figura 41. Efecto de la lirioidenina sobre el tiempo de pérdida del reflejo de enderezamiento en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital. Se representa la media  $\pm$  SEM. La lirioidenina prolongó el tiempo de hipnosis. \*\*\* $P < 0.001$  comparados contra el vehículo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.  $N= 5-6$  ratones por grupo

### 3.3.9 Prueba de la barra

La lirioidenina prolongó el tiempo de permanencia de las patas anteriores del ratón sobre la barra de esta prueba en comparación al grupo del vehículo ( $F_{1,24}= 7.159$ ; \* $P < 0.05$ ) (Figura 42).

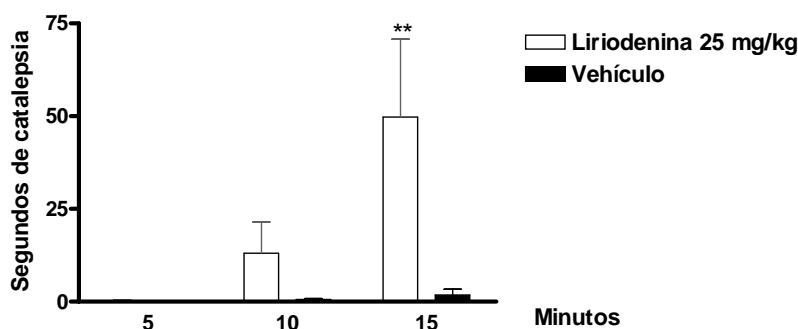


Figura 43. Efecto de la lirioidenina sobre la duración de la catalepsia, medida en la prueba de la barra. Se representa la media  $\pm$  SEM. La lirioidenina prolongó la duración de la catalepsia en comparación al grupo del vehículo. \*\* $P < 0.01$ . ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni.  $N = 5$  ratones por grupo

### 3.3.10 Prueba de hiperactividad inducida por anfetamina

La liriodenina administrada a dosis de 20 mg/kg al igual que el haloperidol (5 mg/kg) inhibió la hiperactividad inducida por anfetamina (3 mg/kg) ( $F_{3,96} = 28.92$ ;  $<0.05$ ) (Figura 43).

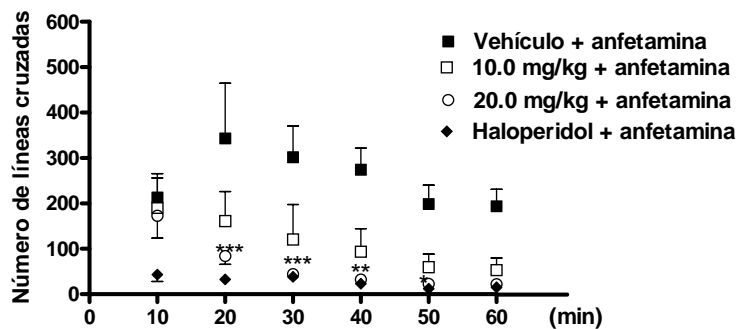


Figura 43. Efecto de la liriodenina sobre la actividad locomotriz en la prueba de hiperactividad inducida por anfetamina. Se representa la media  $\pm$  SEM. La liriodenina al igual que el haloperidol utilizado como control positivo, disminuyeron el número de líneas cruzadas en comparación al grupo del vehículo, representando inhibición de la hiperactividad inducida por la anfetamina. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni.  $N = 6$  ratones por grupo.

#### **4. DISCUSIÓN**

El aislamiento y la evaluación del efecto ansiolítico y sedante de los alcaloides annomontina y liriodenina aislados de extractos clorofórmicos de la *Annona purpurea* constituyen el principal logro de este trabajo.

##### ***Propiedades conductuales de extractos de la A. purpurea***

Estudios previos han señalado la propiedad sedante, anticonvulsiva y ansiolítica, en modelos animales, de los extractos de etanol de *Annona diversifolia* y *A. muricata* así como del extracto de hexano de *A. cherimolia* [Bourne & Egbe, 1979; González-Trujano *et al.*, 1998; Gouemo *et al.*, 1997; López-Rubalcaba *et al.*, 2006].

La administración (3.2, 12.5, 25 y 50 mg/kg) de un extracto alcaloidal total (EAT) de la raíz de la *A. purpurea* resultó poco tóxica para los ratones a corto plazo (48 h) encontrándose la LD<sub>1</sub> (dosis que provoca la primer muerte) por arriba de los 50 mg/kg. El extracto a dosis elevadas (25 mg/kg) prolongó sin embargo el tiempo de hipnosis (lapso de tiempo entre la pérdida y recuperación del reflejo de enderezamiento) en la prueba de la hipnosis inducida por pentobarbital, (Figura 29) sin afectar el tiempo de latencia a la pérdida del reflejo de enderezamiento. Congruente con su baja toxicidad, el extracto alcaloidal total no modificó la actividad exploratoria del ratón (actividad locomotriz horizontal y vertical), ni la coordinación motora, evaluadas en las pruebas de campo abierto y rodillo rodante respectivamente (Cuadros 6 y 7). Así mismo, la administración de EAT fue incapaz de mostrar actividad ansiolítica en la prueba del laberinto elevado en forma de “+” (Cuadro 8).

Los resultados anteriores sugieren que el EAT pudiera tener propiedades sedantes o depresoras del SNC [Morais *et al.*, 1998]. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales usadas no podemos descartar que sus efectos sobre el tiempo de inconciencia en la prueba de la hipnosis inducida por pentobarbital pudieran ser debidos a un incremento de la vida media del pentobarbital, ya que está documentado que algunos extractos provenientes de otras plantas (*Helietta apiculata*) tienen la capacidad inhibir al citocromo P-450, que está involucrado en el metabolismo del pentobarbital [Goloukova *et al.*, 1998; Jakovljevic *et al.*, 2002<sup>a</sup>; Jakovljevic *et al.*, 2002<sup>b</sup>].

El extracto hexánico (EH), resultó por su lado ser mas tóxico y tener mas efectos conductuales que el alcaloidal, a partir de la administración de una dosis de 25 mg/kg, se presentó la muerte del primer ratón (DL<sub>1</sub>) y en contraste con el extracto alcaloidal se obtuvo una DL<sub>50</sub> de 50 mg/kg (Figura 30). Conductualmente la administración sistémica del EH produce sedación y un claro efecto depresor sobre el SNC, pues aparte de prolongar el tiempo de pérdida del reflejo de enderezamiento en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital a dosis bajas (12.5 vs 25 mg/kg) (Figura 34) provocó también una disminución de la actividad motora del ratón en el campo abierto a dosis similares (12.5 y 25 mg/kg) afectando tanto la locomoción horizontal (número de líneas cruzadas) (Figura 31) como la vertical (número de enderezamientos) (Figura 32). En congruencia con sus efectos sedantes, la administración de 25

mg/kg de EH afectó la coordinación motora del animal como lo demuestra el incremento en el número de caídas que los ratones experimentaron en la prueba del rodillo rodante en comparación con los animales tratados con el vehículo (Figura 33).

El extracto hexánico de *A. cherimolia*, demostró poseer propiedades ansiolíticas en dos modelos no condicionados en ratones y sedantes al potencializar los efectos del pentobarbital en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital [López-Rubalcaba *et al.*, 2006]. Sin embargo, aunque la administración del extracto hexánico de *A. purpurea* a dosis de 0.39 y 1.56 mg/kg mostró una clara tendencia ansiolítica (Cuadro 9) incrementando el número de entradas de los ratones a los brazos abiertos del LEFM no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control. Resultados semejantes se observaron en el porcentaje de permanencia de los ratones en estos brazos. Estos resultados demuestran que el extracto hexánico de *A. purpurea* posee propiedades sedantes y depresoras en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital al igual que el extracto hexánico de *A. cherimolia*, sin embargo a diferencia de esta última, carece de actividad ansiolítica.

En conclusión nuestros hallazgos indican que aunque tanto el extracto alcaloidal total como el hexánico poseen efectos depresores sobre el SNC ninguno de ellos, sin embargo tuvo acciones ansiolíticas claras.

### ***Propiedades conductuales de la annomontina***

El laberinto elevado en forma de “+” (LEFM) es un modelo válido para evaluar la ansiedad en los roedores [Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Treit *et al.*, 1993; Pérez de la Mora *et al.*, 2006, 2007, 2010], que como se señaló en la introducción explora la aversión natural de estos animales por los espacios abiertos como consecuencia de su falta de propiedades tigmotácticas [Treit *et al.*, 1993]. En consecuencia, el incremento en el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto observado tras la administración de la annomontina con respecto a su control sugiere que este compuesto posee propiedades ansiolíticas. Propuesta que se ve apoyada por la similitud de los efectos en este modelo, de la annomontina con los del diazepam [Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Treit *et al.*, 1993].

Los efectos de annomontina sobre el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto dependen de la dosis pero de manera lineal. Así, a la dosis de 1 mg/kg, la annomontina no presentó respuesta sobre estos parámetros, pero al incrementar la dosis a 10 mg/kg se obtuvieron resultados significantes, que alcanzaron su nivel máximo con la dosis de 30 mg/kg que fue la dosis más alta del alcaloide (Figura 35 A-B). La razón de esta respuesta no es clara, pero podría deberse a que a la dosis de 10 mg/kg de annomontina los sitios de reconocimiento para el alcaloide están saturados y un incremento en la dosis administrada no se reflejaría en un aumento correlativo del efecto ansiolítico. Otra posibilidad es que bajo nuestras condiciones experimentales no es posible observar, en este modelo, mayores efectos ansiolíticos. La administración de diazepam a 1 mg/kg produjo resultados similares a los obtenidos con annomontina (Figura 35 A-B)



sugiriendo que, bajo nuestras condiciones experimentales, es probable que observe un efecto de techo, que también ha sido visto con dosis altas de midazolam [Amrein & Hetzel, 1990].

La posibilidad de que los efectos observados en el LEFM, se debieran a un incremento de la actividad locomotriz inducida por la annomontina fue descartada al no encontrarse efectos del alcaloide en el número total de entradas a los brazos del laberinto (abiertos + cerrados), el cual es considerado como una buena medida de locomoción en este modelo (Figura 35 C) [Pellow *et al.*, 1985]. Tampoco se observó efectos en la prueba de locomoción practicada en el campo abierto (Cuadro 10). De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con annomontina y aquellos tratados con el disolvente durante la evaluación de la coordinación locomotriz en el rodillo rodante (Cuadro 11). Tampoco se observó efectos en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital (Cuadro 12) indicando que la annomontina es incapaz de modificar el nivel de sedación de los ratones. En vista de lo anterior consideramos que es razonable descartar que los resultados obtenidos en la exploración del LEFM se hubieran debido a cambios en la actividad motora o al nivel del estado de conciencia de los animales.

El mecanismo por el cual la annomontina ejerce su actividad ansiolítica en el LEFM se desconoce. Sin embargo, dado que sus efectos en este modelo fueron antagonizados por la administración previa de flumazenil, un antagonista de las BDZ en el receptor GABA<sub>A</sub> [File, 1982], es posible especular que este receptor este involucrado en la actividad ansiolítica de la annomontina. Particularmente relevante a este respecto es que la annomontina es un alcaloide pirimidina- $\beta$ -carbolina (Fig. 14) y se conoce que las  $\beta$ -carbolinas tienen afinidad por el sitio de fijación de las BDZ en el receptor GABA<sub>A</sub> [Rommelspacher *et al.*, 1980; Braestrup & Nielsen, 1981; Braestrup *et al.*, 1981; Robertson, 1980 citado en Frosthalm *et al.*, 2000; Glennon *et al.*, 2000; Evans & Lowry, 2007]. Adicionalmente, se ha publicado que algunas  $\beta$ -carbolinas como la harmalina, harmalina y el abecarnil son agonistas del sitio de unión de las BDZ al receptor GABA<sub>A</sub> y poseen efectos ansiolíticos [Duka *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 2000; Aricioglu & Altunbas, 2003; Hilber & Chapillon, 2005]. Mientras que otras como la metil-  $\beta$ -carbolina-3-carboxilato ( $\beta$ -CCM) y la metil-6-7- dimetoxi-4-ethyl-  $\beta$ -carbolina-3-carboxylato (DMCM) son agonistas inversos y por consiguiente tienen efectos ansiogénicos y convulsivantes [Crawley *et al.*, 1985].

Sin embargo ha sido informado que algunas  $\beta$ -carbolinas muestran una modesta afinidad por los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>2A</sub> [Glennon *et al.*, 2000], por consiguiente la participación de estos receptores en el efecto ansiolítico de la annomontina no puede ser totalmente excluido. No obstante, los resultados obtenidos en los presentes experimentos sugieren que la participación de los receptores GABA<sub>A</sub> es muy importante o definitiva, ya que la administración previa de flumazenil bloqueó completamente los efectos ansiolíticos de la annomontina.

Llama la atención que la annomontina a diferencia del diazepam no prolongó el tiempo de inconciencia en la prueba de hipnosis inducida por pentobarbital (Cuadro 12), lo que podría significar que la annomontina a pesar de ser menos potente que el diazepam en sus efectos ansiolíticos, posee una mayor selectividad por un subtipo o subtipos de receptor GABA<sub>A</sub>, cuya activación brinda ansiolisis sin sedación.

En conclusión los resultados de este trabajo indican que en el ratón la administración i.p. de annomontina induce efectos ansiolíticos en el LEFM y que estos efectos pudieran estar mediados por la interacción de este alcaloide con el sitio de fijación de las BDZ en el receptor GABA<sub>A</sub>. Serán sin embargo necesarios más estudios para dar claridad al perfil neurofarmacológico completo de la annomontina y conocer la naturaleza y características de su interacción con el sitio de unión de las BDZ al receptor GABA<sub>A</sub>, el sustrato neuroanatómico de su acción y su potencialidad como agente terapéutico en algunos trastornos de ansiedad.

### ***Propiedades conductuales de la liriodenina***

La liriodenina es un alcaloide bencilisoquinolínico (BIQ) que ha sido aislado de varias especies de *Annona* nativas de Chiapas [González-Esquinca, 2001] y al que se le han encontrado un amplio rango de actividades biológicas [Clark *et al.*, 1987; Villar *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1994; Protais *et al.*, 1995; Chulia *et al.*, 1995; Woo *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2001; Mbah *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007].

En este trabajo la probable actividad ansiolítica de la liriodenina fue investigada con el ánimo de extender a otros modelos el hallazgo de Estrada-Reyes (2005) que indica que dicho alcaloide posee efectos ansiolíticos en la caja luz-oscuridad y a que ha sido reportado que los alcaloides BIQ, tienen afinidad por receptores serotoninérgicos que participan en la modulación de la ansiedad [Shoji *et al.*, 1987; Hasrat *et al.*, 1997; Catret *et al.*, 1998]. Así, estudios realizados utilizando diversos tipos de agonistas y antagonistas serotoninérgicos administrados por vía sistémica han indicado que los agonistas selectivos para los receptores 5HT<sub>2</sub> y 5HT<sub>1C</sub> son ansiogénicos mientras que sus antagonistas y los de los receptores 5HT<sub>3</sub> son ansiolíticos [Lister, 1990; Handley *et al.*, 1993]. De igual forma los agonistas 5HT<sub>1A</sub> muestran un perfil ansiolítico [Dourish, 1986., citado por Handley *et al.*, 1993]. La buspirona (agonista 5HT<sub>1A</sub>) y el ondansetrón (antagonista 5HT<sub>3</sub>) tienen efectos ansiolíticos en diversos modelos para la ansiedad [Costall *et al.*, 1988; Matsushita *et al.*, 2005], aunque debe ser sin embargo considerado que en el laberinto elevado en forma de “+” tanto la buspirona como el ondansetrón han producido efectos contradictorios, habiéndose reportado tanto efectos ansiolíticos como ansiogénicos o aun la falta de efectos de estos fármacos sobre la exploración de este paradigma [Handley *et al.*, 1993].

Los resultados obtenidos mediante la utilización de cuatro modelos no condicionados para evaluar la ansiedad; el laberinto elevado en forma de “+”, la caja luz/oscuridad, el enterramiento de canicas y la plataforma con orificios no apoyan sin embargo el supuesto efecto ansiolítico de la liriodenina. Así, a

diferencia de lo encontrado por Estrada-Reyes (2005) en la caja luz-oscuridad, en nuestros estudios, usando el mismo modelo, la lirioidenina administrada a dosis de 0.6, 1.2, 2.5 y 5 mg/kg i.p., no produjo cambios en el número de transiciones entre los espacios iluminados y no iluminados de la caja luz-oscuridad ni en el tiempo de permanencia de los ratones en el área iluminada de la caja (Cuadro 14) en comparación con los controles. La razón de esta diferencia en los efectos de la lirioidenina es poco clara pero pudiera estar relacionada con diferencias de procedimiento durante la aplicación de esta prueba (horario, luminosidad, solvente, integración de los grupos) o con el uso de diferentes cepas de ratones (cepa Swiss Webster *versus* Balb/C utilizada por nosotros).

Por otro lado, como se señaló anteriormente la inhibición del enterramiento de canicas se ha propuesto como una prueba para identificar compuestos ansiolíticos [Njung'e & Handley, 1991]. Nuestros estudios en esta prueba indican que la lirioidenina a dosis altas (5 y 10 mg/kg) produce una clara disminución en el número de canicas enterradas en comparación con el grupo inyectado con el vehículo (Figura 37), lo que permite presuponer una actividad ansiolítica para este compuesto. Sin embargo, la observación de que la actividad motora de los ratones tratados con lirioidenina este disminuida a la dosis que provoca los mayores efectos ansiolíticos de este alcaloide (10 mg/kg) (Figura 38) da poca confiabilidad a los resultados, pues la disminución en el enterramiento de canicas observado podría haber ocurrido como resultado de una interferencia con el estado motor de los animales y no como consecuencia de una disminución en su ansiedad. Estudios tendientes a dissociar los efectos de la lirioidenina sobre la esfera locomotriz y la ansiedad en esta prueba serían fundamentales para resolver esta interrogante.

En apoyo a la falta de efectos de la lirioidenina sobre la ansiedad cabe señalar que este alcaloide fue incapaz de mostrar actividad ansiolítica en el laberinto elevado en forma de "+" pues su administración a dosis de 1.2, 2.5, 5 y 10 mg/kg i.p., no indujo ningún cambio en el número de entradas de los ratones y/o el tiempo de su permanencia en los brazos abiertos del laberinto (Cuadro 13). De la misma manera, en la prueba de la plataforma con orificios la lirioidenina a dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg i.p. fue incapáz de incrementar el número de exploraciones (veces que el ratón introduce su cabeza hasta el nivel de sus orejas en los orificios de esta prueba) (Cuadro 15), utilizado como un parámetro ansiogénico [Takeda *et al.*, 1998].

Aunque nuestros estudios indicaron que la lirioidenina carece de efectos ansiolíticos pusieron de manifiesto que tiene claros efectos sedantes pues tras su administración sistémica, aparte de la ptosis palpebral y de la marcada sedación producida, se observó una disminución de la actividad motora espontánea en la prueba de campo abierto (Figura 39 y 40), pérdida de la coordinación locomotriz en la prueba del rodillo rodante (Cuadro 16), así como la prolongación del tiempo de hipnosis inducida por el pentobarbital (Figura 41).

Más aun, nuestros estudios sugieren que a diferencia de la annomontina la lirioidenina pudiera ejercer al menos algunos de sus efectos como

consecuencia de una interferencia con la neurotransmisión dopaminérgica no ligada a la modulación de la ansiedad, pues su administración por arriba de los 10 mg /kg aumentó la inmovilidad de los ratones en la prueba de la barra (Figura 42), que se considera una conducta cataléptica asociada con grados incrementados de rigidez muscular (Klemm, 1985<sup>a</sup>; 1985<sup>b</sup>) asociados al bloqueo de los receptores estriatales D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> [Sanberg *et al.*, 1988]. Adicionalmente la liriodenina bloqueo el aumento de la locomoción inducido por la administración de anfetamina (Figura 43). Dado que la liriodenina solo posee una débil afinidad por los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. [Protais *et al.*, 1995] los efectos anti-dopaminérgicos observados en este trabajo pudieran estar relacionados a la inhibición que este alcaloide ejerce sobre la síntesis y liberación de la dopamina [Jin *et al.*, 2007], pues ha sido encontrado que la liriodenina, inhibe parcialmente tanto la actividad de la TH como su expresión génica, amén que otros alcaloides benzilisoquinolínicos como la anonaina inhiben también la biosíntesis de la dopamina [Lee *et al.*, 2008]. Finalmente, el bloqueo de la hiperactividad inducida por la anfetamina, que surge como consecuencia de la liberación de dopamina desde sus terminaciones nerviosas en el sistema mesolímbico [Hoffman *et al.*, 1996] sugiere que la liriodenina podría haber interferido con los mecanismos de liberación de dopamina en las estructuras que conforman dicho sistema.

## 5. CONCLUSIONES

La limitación existente en la disponibilidad de fármacos eficaces, selectivos y con pocos efectos colaterales para el tratamiento de diversos padecimientos ha hecho que tornemos nuestra cabeza hacia la medicina tradicional en busca de mejores alternativas terapéuticas. Dentro de las posibilidades existentes las *annonas* representan por sus amplios usos en la medicina tradicional una fuente potencial de medicamentos para el tratamiento de algunas enfermedades mentales de alta incidencia en nuestro medio como lo son los trastornos de la ansiedad y algunos trastornos que cursan con marcada agitación psicomotriz.

En este trabajo, mediante cromatografía de adsorción en gel de sílice se logró el aislamiento a partir de extractos clorofórmicos de raíces de la *Annona purpúrea* de cantidades substanciales de dos alcaloides, la annomontina y la liriodenina. El primero de ellos pertenece al tipo de alcaloides de la clase de las  $\beta$ -carbolinas [Leboeuf *et al.*, 1982<sup>a</sup>] y el segundo posee una estructura bencilisoquinolinica [Buchanan & Dickey, 1960]. Ambos poseen, como podría predecirse de sus estructuras químicas disímolos efectos biológicos. La annomontina posee efectos ansiolíticos que parecerían ejercerse a través de su interacción con los sitios receptores a las benzodiazepinas sobre los receptores GABA<sub>A</sub>. La liriodenina aunque carece de acciones ansiolíticas posee claros efectos sedantes que podrían resultar de una interferencia con la síntesis y liberación de la dopamina [Jin *et al.*, 2007], pues aunque algunos alcaloides bencilisoquinolínicos poseen una débil afinidad por las familias de receptores dopaminérgico D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> [Protais *et al.*, 1995] tienen efectos inhibitorios sobre la síntesis y liberación de la dopamina [Shin *et al.*, 1998, 2001; Kim *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008].

Así, en este momento, en que la prevalencia de los trastornos de ansiedad aumenta y las benzodiazepinas permanecen como los fármacos más empleados a pesar de sus efectos adversos entre los que destacan la sedación y sus efectos hipnóticos, los alcaloides con estructura de  $\beta$ -carbolinas, entre los que destaca el abecarnil que ya se encuentra en fase preclínica constituyen una nueva e interesante alternativa terapéutica. Nuestros estudios abren la puerta a la posibilidad que la annomontina, por su falta de efectos en la esfera motora y sus efectos sedantes tan limitados, o algún derivado de ella pudiera ser usado como un agente ansiolítico. Por su parte, la liriodenina, dado su potencial anti-dopaminérgico, puesto de manifiesto en este trabajo pudiera ser considerado como un potencial agente terapéutico para algunos trastornos en los que la neurotransmisión dopaminérgica pudiera estar aumentada.

## 6.0 LITERATURA CITADA

Ahlqvist J, Isacson R, Wahlestedt C, Salmi P. Anti-cataleptic effects of clozapine, but not olanzapine and quetiapine, on SCH 23390- or raclopride-induced catalepsy in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003; 13(3): 177-782.

Alvarez-Cervera FJ, Villanueva-Toledo J, Moo-Puc RE, Heredia-López FJ, Alvarez-Cervera M, Pineda JC, Góngora-Alfaro JL. A novel automated rat catalepsy bar test system based on a RISC microcontroller. *J Neurosci Methods*. 2005; 146(1): 78-83.

Amin J, Brooks-Kayal A, Weiss DS. Two tyrosine residues on the  $\alpha$  subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharm*. 1997; 51: 833-841.

Amrein R, Hetzel W. Pharmacology of Dormicum (midazolam) and Anexate (flumazenil). *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1990; 92: 6-15.

Anderson NJ, Robinson ESJ, Husbands SM, Delagrangé P, Nutt DJ, Hudson AL. Characterisation of [3H]harmane binding to rat whole brain membranes. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 1009: 175–179.

Archer J. Tests for Emotionality in Rats and Mice: a Review. *Animal Behav*. 1973; 21: 205-235.

Aricioglu F, Altunbas H. Harmane Induces Anxiolysis and Antidepressant-Like Effects in Rats. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 1009: 196–201.

Arnaud C, Gauthier P, Gottesmann C. Study of a GABA<sub>C</sub> receptor antagonist on sleep-waking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001; 154: 415–419.

Asencio M, Delaquerrière B, Cassels BK, Speisky H, Comoy E, Potais P. Biochemical and behavioral effects of boldine and glaucine on dopamine systems. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999; 62(1): 7-13.

Asencio M, Hurtado-Guzman C, Lopez JJ, B. Cassels BK, Potais P, Chagraoui A. Structure–affinity relationship of halogenated predicentrine and glaucine derivatives at D1 and D2 dopaminergic receptors: halogenation and D1 receptor selectivity. *Bioorg Med Chem*. 2005; 13(11): 3699-3704.

Auta J, Winsauer PJ, Faust WB, Lambert P, Moerschbaeher JM. Effects of negative allosteric modulators of gamma-aminobutyric acidA receptors on complex behavioral processes in monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280(1): 316-325.

Bahena-Trujillo R, Gonzalo Flores, Arias-Montaña JA. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*. 2000; 11: 39-60.

- Baldessarini RJ, Tarazi FI. Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harv Rev Psychiatry*. 1996; 3(6): 301-325.
- Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P. The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2001; 11(6): 449-455.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*. 1998; 50(2): 291-313.
- Basile AS, Lippa AS, Skolnick P. Anxiolytic anxiolytics: can less be more? *Eur J Pharmacol*. 2004; 500(1-3): 441-451.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011; 63(1): 182-217.
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2001; 125: 141-149.
- Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep*. 2005; 22(2): 269-303.
- Bhattacharya SK, Bose R, Ghosh P, Tripathi VJ, Ray AB, Dasgupta B. Psychopharmacological studies on (–)-nuciferine and its Hofmann degradation product atherosperminine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1978; 59(1): 29-33.
- Bormann J. The ‘ABC’ of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2000; 21(1): 16-19.
- Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology*. 2002; 163: 121–141.
- Bourne RK, Egbe PC. A preliminary study of the sedative effects of *Annona muricata* (sour sop). *West Indian Med J*. 1979; 28: 106–110.
- Bowery NG. GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993; 33: 109-147.
- Braestrup C, Nielsen M, Skovbjerg H, Gredal O. beta-Carboline-3-carboxylates and benzodiazepine receptors. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981; 26: 147-155.
- Braestrup C, Nielsen M. GABA reduces binding of 3H-methyl beta-carboline-3-carboxylate to brain benzodiazepine receptors. *Nature*. 1981; 294(5840): 472-474.

- Braestrup C, Schmiechen R, Neef G, Nielsen M, Petersen EN. Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. *Science*. 1982; 216: 1241-1243.
- Buchanan MA, Dickey EE. Liriodenine, A Nitrogen-Containing Pigment of Yellow Poplar Heartwood (*Liriodendron tulipifera*, L.). *J Org Chem*. 1960; 25(8): 1389-1391.
- Buffa B, Costa G, Ghirardi P. Glaziovine versus diazepam: a double-blind clinical trial. *Ther Res Clin Exp*. 1974; 16: 621-627.
- Burt DR. Reducing GABA receptors. *Life Sci*. 2003. 22; 73(14): 1741-1758.
- Calderón SF, Sanberg PR, Norman AB. Quinolinic acid lesions of rat striatum abolish D1 and D2-dopamine receptor-mediated catalepsy. *Brain Res*. 1988; 450: 403-407.
- Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Curr Med Chem*. 2007; 14(4): 479-500.
- Caparros-Lefebvre D, Elbaz A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. Caribbean Parkinsonism Study Group. *Lancet*. 1999; 354(9175): 281-286.
- Carballo AI, Martínez AL, González-Trujano ME, Pellicer F, Ventura-Martínez R, Díaz-Reval MI, López-Muñoz FJ. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010; 95(1): 6-12.
- Catret M, Ivorra MD, Dcón MP, Anselmi E. The 5-HT and alpha-adrenoceptor antagonist effect of four benzyloquinoline alkaloids on rat aorta. *J Pharm Pharmacol*. 1998; 50(3): 317-322.
- Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae. *Fortschr Chem Org Naturst*. 1997; 70: 81-288.
- Champatisingh D, Sahu PK, Pal A, Nanda GS. Anticataleptic and antiepileptic activity of ethanolic extract of leaves of *Mucuna pruriens*: A study on role of dopaminergic system in epilepsy in albino rats. *Indian J Pharmacol*. 2011; 43(2): 197-199.
- Chang FR, Chen CY, Wu PH, Kuo RY, Chang YC, Wu YC. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J Nat Prod*, 2000; 63(6): 746-748.
- Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *J Nat Prod*. 1998<sup>b</sup>; 61(12): 1457-1461.
- Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*. 1998<sup>a</sup>; 49(7): 2015-2018.



- Chang GJ, WU MH, Wu YC, Su MJ. Electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy and positive inotropy of liriodenine, a natural aporphine alkaloid from *Fissistigma glaucescens*. *Br J Pharmacol*. 1996; 118(7): 1571-1583.
- Chang HC, Chang FR, Wu YC, Lai YH. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. *Kaohsiung J Med Sci*. 2004; 20(8): 365-371.
- Chang KC, Su MJ, Peng YI, Shao CC, Wu YC, Tseng YZ. Mechanical effects of liriodenine on the left ventricular-arterial coupling in Wistar rats: pressure-stroke volume analysis. *Br J Pharmacol*. 2001; 133: 29-36.
- Chang W, Cheng CH, Wu Y, Su M. The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia-reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric Oxide*. 2004; 11: 307-315.
- Charney DS. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychol Scand*. 2003; 108 (417): 38-50.
- Chebib M, Hinton T, Schmid KL. Novel, potent, and selective GABA<sub>C</sub> antagonists inhibit myopia development and facilitate learning and memory. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 328: 448-457.
- Chebib M, Johnston GA, Mattsson JP, Rydstrom K, Nilsson K, Qiu J, Stevenson SH, Silverman RB. Aminomethyl-2,6-difluorophenols as a novel class of increased lipophilicity GABA(C) receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9(21): 3093-3098.
- Chebib M, Johnston GAR. GABA activated ligand gated ion channels: Medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem*. 2000; 43: 1427-1447.
- Chen CY, Chang FR, Pan WB, Wu YC. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 2001; 56(7): 753-757.
- Chen YF, Kuo PC, Chan HH, Kuo IJ, Lin FW, Su CR, Yang ML, Li DT, Wu TS.  $\beta$ -carboline alkaloids from *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* and their anti-inflammatory activity. *J Nat Prod*. 2010; 73(12): 1993-1998.
- Cho DI, Zheng M, Kim KM. Current perspectives on the selective regulation of D2 and D3 receptors. *Arch Pharm Res*. 2010; 33(10): 1521-1538.
- Chulia S, Noguera MA, Ibarra MD, Cortes D, D'Ocon P. Vasodilator effects of liriodenine and norushinsunine, two aporphine alkaloids isolated from *Annona cherimolia*, in rat aorta. *Pharmacology*. 1995; 50(6): 380-387.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993; 33: 281-307.

Clark A, Watson ES, Ashfaq K, Hufford C. In Vivo Efficacy of Antifungal Oxoaphorfine Alkaloids in Experimental Disseminated Candidiasis. *Pharm Res.* 1987; 4(6): 495-498.

Clement Y, Joubert C, Kopp C, Lepicard E, Venault P, Misslin R, Cadot M, Chapouthier G. Anxiety in Mice: A Principal Component Analysis Study. *Neural Plast.* 2007; 2007: 1-8.

Cooper J, Bloom F, Roht R. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* Oxford University Press, New York, 2003.

Costa EV, Pinheiro ML, de Souza AD, Dos Santos AG, Campos FR, Ferreira AG, Barison A. Full NMR analysis of annomontine, methoxy- annomontine and N-hydroxyannomontine pyrimidine-beta-carboline alkaloids. *Magn Reson Chem.* 2008; 46(1): 69-74.

Costa EV, Pinheiro ML, Xavier CM, Silva JR, Amaral AC, Souza AD, Barison A, Campos FR, Ferreira AG, Machado GM, Leon LL. A pyrimidine-beta-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *J Nat Prod.* 2006; 69(2): 292-294

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Taylor RJ, Tomkins DM. Exploration of Mice in a Black and White Test Box: Validation as a Model of Anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 32: 777-785.

Cox ED, Diaz-Arauzo H, Huang Q, Reddy MS, Ma C, Harris B, McKernan R, Skolnick P, Cook JM. Synthesis and evaluation of analogues of the partial agonist 6-(propyloxy)-4-(methoxymethyl)-beta-carboline-3-carboxylic acid ethyl ester (6-PBC) and the full agonist 6-(benzyloxy)-4-(methoxymethyl)-beta-carboline-3-carboxylic acid ethyl ester (Zk 93423) at wild type and recombinant GABAA receptors. *J Med Chem.* 1998; 41(14): 2537-2552.

Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980; 13(2): 167-170.

Crawley JN, Ninan PT, Pickar D, Chrousos GP, Linnoila M, Skolnick P, Paul SM. Neuropharmacological antagonism of the beta-carboline-induced "anxiety" response in rhesus monkeys. *J Neurosci.* 1985; 5(2): 477-485.

Da Settimo F, Taliani S, Trincavelli ML, Montali M, Martini C. GABA A/Bz receptor subtypes as targets for selective drugs. *Curr Med Chem.* 2007; 14(25): 2680-2701.

Da Silva AL, Elisabetsky E. Interference of propylene glycol with the hole-board test. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(4): 545-547.

Dalley JW, Everitt BJ. Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20: 403-410.

- Davidson JR, Feltner DE, Dugar A. Management of generalized anxiety disorder in primary care: identifying the challenges and unmet needs. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2010; 12(2). pii: PCC.09r00772.
- Dawson GR., Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci*. 1995; 16; 33–36.
- Debiec J, LeDoux JE. Fear and the brain. *Soc Res (New York)*. 2004; 71(4): 807-818.
- Dhawan K., Kumar S., Sharma A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J Ethnopharmacol*. 2001; 78: 165–170.
- Dias KL, Da Silva Dias C, Barbosa-Filho JM, Almeida RN, De Azevedo Correia N, Medeiros IA. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. *Planta Med*. 2004; 70(4): 328-233.
- Duka T, Schütt B, Krause W, Dorow R, McDonald S, Fichte K. Human studies on abecarnil a new beta-carboline anxiolytic: safety, tolerability and preliminary pharmacological profile. *Br J Clin Pharmacol*. 1993; 35(4): 386-394.
- Elsworth JD, Roth RH. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1997; 144(1): 4-9.
- Escobar AE, Pérez BO, Ramírez VA Sansores RH. Efecto del daño de vías dopaminérgicas mesencefálicas en la conducta adictiva al tabaco. Revisión generadora de una hipótesis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2007; 20(1): 56-62.
- Estrada-Reyes R. 2005. Estudio químico y evaluación farmacológica de las propiedades ansiolíticas, hipnóticas y anticonvulsivas de *Annona cherimolia*, *Annona lutescens* y *Rollinia mucosa*. *Catálogo de tesis. TESIUNAM*.
- Evans AK, Lowry CA. Pharmacology of the  $\beta$ -Carboline FG-7142, a PartialInverse Agonist at the Benzodiazepine Allosteric Site of the GABAA Receptor: Neurochemical, Neurophysiological, and Behavioral Effects. *CNS Drug Rev*. 2007; 13(4): 475–501.
- Evans SR, Hofmann A. *Plantas de los Dioses*. 2da Ed. Ljubljana/Slovenia. Fondo de Cultura Economica; 2008: 67.
- Ferré S, Guix, T, Prat G, Jane F, Casas M. Is Experimental Catalepsy Properly Measured. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990; 35: 753-757.
- File SE. Recovery from lorazepam tolerance and the effects of a benzodiazepine antagonist (RO 15-1788) on the development of tolerance. *Psychopharmacology (Berl)*. 1982; 77(3): 284-288.
- File SE, Pellos S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Brit J Pharmacol*. 1985; 86 (3): 729-735.

Fink KF, Göthert M. 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. *Pharmacol Rev.* 2007; 59: 360–417.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 681–698.

Franklin ME, Foa EB. Treatment of obsessive compulsive disorder. *Annu Rev Clin Psychol.* 2011; 7: 229-243.

Frostholm A, Evans JE, Cummings SL, Rotter A. Harmaline-induced changes in gamma aminobutyric acidA receptor subunit mRNA expression in murine olivocerebellar nuclei. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; 85: 200-208.

Fujisawa H, Okuno S. Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338: 271–276.

Fujiwara H. Comparative studies of sulpiride and classical neuroleptics on induction of catalepsy, locomotor activity, and brain dopamine metabolism in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992; 41: 301-308.

Gibbs ME, Johnston GAR. Opposing roles for GABAA and GABA<sub>C</sub> receptors in short-term memory formation in young chicks. *Neuroscience.* 2005; 131: 567–576.

Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, Smith C, Egan C, Davis K, Mattson MV. Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin 5-HT(2) and 5-HT(1A), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend.* 2000; 60(2): 121-132.

Goloukova TD, Heckler E, Rates SM, Henriques JA, Henriques AT. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiates the hypnotic action of pentobarbital. *J Ethnopharmacol.* 1998; 60: 141-148.

González-Esquinca AR. 2001. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae) análisis filoquímico de tres especies del Estado de Chiapas. México. Catalogo de tesis. TESIUNAM.

González-Trujano ME, Martínez AL, Reyes-Ramírez A, Reyes-Trejo B, Navarrete A. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Med.* 2006; 72(8): 703-707.

González-Trujano ME, Navarrete A, Reyes B, Cedillo-Portugal E, Hong E. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Med.* 2001; 67(2): 136-141.

González-Trujano ME, Navarrete A, Reyes B, Hong E. Some Pharmacological Effect of Leaves of *Annona diversifolia* on the Central Nervous System in Mice. *Phytother Res.* 1998; 12: 1-3.

- Goodman A. Neurobiology of addiction: an integrative review. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75(1): 266–322.
- Gorman JM, Hirschfeld RM, Ninan PT. New Developments in the Neurobiological Basis of Anxiety Disorders. *Psychopharmacol Bull.* 2002; 36(2): 49-67.
- Gouemo P, Koudogbo B, Tchivounda HP, Akono-Nguema C, Etoua MM. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phytother Res.* 1997; 11(3): 243-245.
- Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Bioscience Report.* 2001; 21(3): 247-269.
- Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Kelsoe JR. Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet.* 2001; 105(2): 145-151.
- Grundmann O, Nakajima JI, Seo S, Butterweck V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol.* 2006; 110: 406–411.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. Aporphinoid Alkaloids, II<sup>1</sup>. *J Nat Prod.* 1975; 42(4): 325-360.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. Aporphinoid Alkaloids, V. *J Nat Prod.* 1994; 57(8): 1033-1135.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A. Aporphinoid Alkaloids, IV<sup>1</sup>. *J Nat Prod.* 1988; 51(3): 389-474.
- Gupta MP (1995). In: Gupta MP (ed) 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Cytel. pp 26-28.
- Haarmann-Stemmann T, Sendker J, Götz C, Krug N, Bothe H, Fritsche E, Proksch P, Abel J. Regulation of dioxin receptor function by different beta-carboline alkaloids. *Arch Toxicol.* 2010; 84(8): 619-629.
- Halbreich U, Kinon BJ, Gilmore JA, Kahn LS. Elevated prolactin levels in patients with schizophrenia: mechanisms and related adverse effects. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28: 53–67.
- Hale MW, Johnson PL, Westerman AM, Abrams JK, Shekhar A, Lowry CA. Multiple anxiogenic drugs recruit a parvalbumin-containing subpopulation of GABAergic interneurons in the basolateral amygdala. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 34(7): 1285-1293.
- Handley SL, McBlane JW, Critchley MA, Njung'e K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res.* 1993; 58(1-2): 203-210.

Harwood DT, Urban S, Blunt JW, Munro MH. Beta-carboline alkaloids from a New Zealand marine bryozoan, *Cribricellina cribraria*. *Nat Prod Res.* 2003; 17(1): 15-29.

Hasrat JA, Bruyne T, Backer JP, Vauquelin G, Vlietinck AJ. Isoquinoline Derivatives Isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 49: 1145-1149.

Herraiz T, González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán VJ, Guillén H. beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(3): 839-845.

Hilber P, Chapillon P. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. *Physiol Behav.* 2005; 86: 164-167.

Hoffman BB, Lefkowitz RJ. 1996. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.M., Ruddon, R.W., Gilman, A.G. (Eds.), *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 199–248.

Hofmann SG, Ellard KK, Siegle GJ. Neurobiological correlates of cognitions in fear and anxiety: A cognitive-neurobiological information-processing model. *Cogn Emot.* 2011 Aug 1. [Epub ahead of print]

Hollinshead SP, Trudell ML, Skolnick P, Cook JM. Structural requirements for agonist actions at the benzodiazepine receptor: studies with analogues of 6-(benzyloxy)-4-(methoxymethyl)-beta-carboline-3-carboxylic acid ethyl ester. *J Med Chem.* 1990; 33(3): 1062-1069.

Hsieh T, Liu T, Chern C, Tsao D, Lu F, Syu Y, Hsieh P, Hu H, Chang T, Chen Ch. Liriodenine inhibits the proliferation of human hepatoma cell lines by blocking cell cycle progression and nitric oxide-mediated activation of p53 expression. *Food and Chemical Toxicology.* 2005; 43: 1117–1126.

Husbands SM, Glennon RA, Gorgerat S, Gough R, Tyacke R, Crosby J, Nutt DJ, Lewis JW, Hudson AL.  $\beta$ -carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 64 (2): 203-208.

Ichimaru Y, Egawa T, Sawa A. 5-HT<sub>1A</sub>-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1995; 68: 65–70.

Ichinose H, Nagatsu T. [Molecular genetics of aromatic L-amino acid decarboxylase]. *Yakubutsu Seishin Kodo.* 1993; 4: 251-256.

Jakovljevic V, Raskovic A, Popovic M, Sabo J. The effect of celery and parsley juices on the pharmacodynamic activity of drugs involving cytochrome P450 in their metabolism. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2002<sup>a</sup>; 27: 153-156.

Jakovljevic V, Raskovic A, Popovic M, Sabo J Bursac M. The effect of methoxsalene of hypnotic and subhypnotic doses of pentobarbital. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2002<sup>b</sup>; 27: 149-151.

Jaspers MW, Bashir AK, Zwaving JH, Malingré TM. Investigation of *Grewia bicolor* Juss. *J Ethnopharmacol.* 1986; 17(3): 205-211.

Jin CM, Lee JJ, Yang YJ, Kim YM, Kim YK, Ryu SY, Lee MK. Liriodenine Inhibits Dopamine Biosynthesis and L-DOPA Induced Dopamine Content in PC12 Cells. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(8): 984-990.

Johnston GAR, Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN. GABA<sub>C</sub> receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2003; 2: 260–268.

Johnston GAR, Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN. Neurochemicals for the Investigation of GABAC Receptors. *Neurochem Res.* 2010; 35: 1970–1977.

Jung ME, Wallis CJ, Gatch MB, Lal H. Abecarnil and alprazolam reverse anxiety-like behaviors induced by ethanol withdrawal. *Alcohol.* 2000; 21(2): 161-168.

Kameia J, Matsunawaa Y, Miyataa S, Tanakab S, Saitoha A. Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test. *Eur J Pharmacol.* 2004; 489: 77– 87.

Kenneth WB.  $\beta$ -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat Prod Rep.* 1999; 16: 367-388.

Kidman A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. *Prog Neurobiol.* 1989; 32(5): 391-402.

Kim YM, Kim MN, Lee JJ, Lee MK. Inhibition of dopamine biosynthesis by tetrahydropapaveroline. *Neurosci Lett.* 2005; 386(1): 1-4.

Klemm WR. Evidence for a cholinergic role in haloperidol-induced catalepsy. *Psychopharmacology.* 1985<sup>b</sup>; 85: 139-142.

Klemm WR. Neuroleptic-induced catalepsy: A D2 blockade phenomenon? *Pharmacol Biochem Behav.* 1985<sup>a</sup>; 19: 911-915.

Laakso A, Bergman J, Haaparanta M, Vilkmán H, Solin O, Syvälahti E, Hietala J. Decreased striatal dopamine transporter binding in vivo in chronic schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001; 52(1-2): 115-120.

Laakso A, Vilkmán H, Kajander J, Bergman J, paranta M, Solin O, Hietala J. Prediction of detached personality in healthy subjects by low dopamine transporter binding. *Am J Psychiatry.* 2000; 157(2): 290-292.

Lannuzel A, Michel PP, Caparros-lefebvre D, Abaul J, Hocquemiller R, Ruberg M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord.* 2002; 17(1): 84-90.

Lappalainen J, Hietala J, Syvälahti, E. Differential tolerance to cataleptic effects of SCH-23390 and haloperidol after repeated administration. *Psychopharmacology.* 1989; 98: 472-475.

Leboeuf M, Cavé A, Forgacs P, Provost J, Chiaroni A, Riche C. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and Methoxyannomontine, two new Pyrimidine-P Carboline-type Alkaloids from *Annona Montana*. *J Chem Soc Perkin 1982<sup>a</sup>*; 1: 1205-1208.

Leboeuf M, Cavé A, Forgacs P, Tiberghien R, Provost J, Touche A, Jacquemin H. Alcaloïdes Des Annonacées XL<sup>+</sup>: Étude Chimique Et Pharmacologique Des Alcaloïdes De L' *Annona Montana* MACF. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 1982<sup>b</sup>; 3: 169-184.

LeDoux JE. Emotion circuit in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23: 155-184.

Lee JJ, Jin CM, Kim YK, Ryu SY, Lim SC, Lee MK. Effects of anonaine on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Molecules.* 2008; 13(2): 475-487.

Li S, Yang B, Zhang Q, Zhang J, Wang J, Wu W. Synthesis and bioactivity of beta-carboline derivatives. *Nat Prod Commun.* 2010; 5(10): 1591-1596.

Lin CH, Yang CM, KO FN, Wu YC, Teng CM. Antimuscarinic action of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, in canine tracheal smooth muscle. *J Pharmacol.* 1994; 113(4): 1464-1470.

Lipkind D, Sakov A, Kafkafi N, Elmer GI, Benjamini Y, Golani I. New replicable anxiety-related measures of wall vs.center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 347–359.

Liscombe DK, Facchini PJ. Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19(2): 173-180.

Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 1990; 46(3): 321-340.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 1987; 92: 180-185.

Liu B, Hattori N, Zhang NY, Wu B, Yang L, Kitagawa K, Xiong ZM, Irie T, Inagaki C. Anxiolytic agent, dihydrohonokiol B, recovers amyloid beta proteininduced neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 2005; 384: 44–47.



Loghini F, Chagraoui A, Asenio M, Comoy M, Cassels BK, Speisky H, Protais P. Effects of some antioxidative aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. *Eur J Pharm Sci.* 2002; 18: 133-140.

López-Rubalcava C, Piña-Medina B, Estrada-Reyes R, Heinze G, Martínez-Vázquez M. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sci.* 2006; 78: 730–737.

Madrero Y, Elorriaga M, Martínez S, Noguera MA, Cassels BK, D'Ocon P, Ivorra MD. A possible structural determinant of selectivity of boldine and derivatives for the alpha 1A-adrenoceptor subtype. *J Pharmacol.* 1996; 119: 1563-1568.

Maksay G., Thompson SA, Walford KA. Allosteric modulators affect the efficacy of partial agonists for recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 1794 – 1800.

Maren S. Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 897-931.

Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B. GABA<sub>B</sub> receptors – the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20: 396-399.

Martínez M. 1982. *Las plantas medicinales de México* FCE, México. 481.

Matsushita M, Egashira N, Harada S, Okuno R, Mishima K, Iwasaki K, Nishimura R, Fujiwara M. Perospirone, a Novel Antipsychotic Drug, Inhibits Marble-Burying Behavior via 5-HT<sub>1A</sub> Receptor in Mice: Implications for Obsessive-Compulsive Disorder. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99: 154 – 159.

May T, Strauss S, Rommelspacher H. [<sup>3</sup>H]Harman labels selectively and with high affinity the active site of monoamine oxidase (EC 1.4.3.4) subtype A(MAO-A) in rat, marmoset, and pig. *J Neural Transm Suppl.* 1990; 32: 93–102.

Mbah JA, Tane P, Ngadjui BT, Connolly JD, Okunji CC, Iwu MM, Schuster BM. Antiplasmodial agents from the leaves of *Glossocalyx brevipes*. *Planta Med.* 2004; 70(5): 437-440.

McCormick SJ, Tunnicliff G. Inhibitors of Synaptosomal  $\gamma$ -Hydroxybutyrate Transport. *Pharmacology.* 1998; 57: 124-131.

McKernan RM, Whiting PJ. Which GABA<sub>A</sub> receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.* 1996; 19: 139–143.

Meyer ME, Cottrell GA, Hartesveldt C. Dopamine D1 antagonists potentiate the durations of bar and cling catalepsy and the dorsal immobility response in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992; 41: 507-510.

- Morais LC, Barbosa-Filho JM, Almeida RN. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *J Ethnopharmacol.* 1998; 62(1): 57-61.
- Morton JF. 1987. "Soncoya". In: *Fruits of Warm Climates.* Miami, Florida. p 85
- Nafisi S, Bonsaii M, Maali P, Khalilzadeh MA, Manouchehri F. Beta-carboline alkaloids bind DNA. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 100(2): 84-91.
- Nagatsu T. Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci Res.* 1991; 12: 315-345.
- Narahashi T. Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini Rev Med Chem.* 2002; 2(4): 419-432.
- Ninam PT. The Functional Anatomy, Neurochemistry, and Pharmacology of Anxiety. *J Clin Psychiatry.* 1999; 60(22): 12–17.
- Nitsche MA, Monte-Silva K, Kuo MF, Paulus W. Dopaminergic impact on cortical excitability in humans. *Rev Neurosci.* 2010; 21(4): 289-298.
- Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 38: 63–67.
- Ohl F, Holsboer F, Landgraf R. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 2001; 33 (3): 392-397.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985; 14(3): 149-167.
- Pérez-Amador MC, González-Esquinca A, Morales MC. Oxoaporphine alkaloids in *Guatteria diospyroides* Baill and *Annona squamosa* L. (Annonaceae). *Ohyton* (2004) 53-55.
- Pérez de la Mora M, Flores-Gracias C, Crespo-Ramírez M, Hernández-Gómez AM, Lara García D. La amígdala, una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad. (2007) En: *Investigación en neurociencias, Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco.* Ruth de Celis (Ed) Bios-Médica, Guadalajara, Jal. México p.p 165- 179.
- Pérez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K. Role of the dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol.* 2010; 90: 198-216.
- Pérez de la Mora M, Hernández-Gómez AM, Arizmendi-García Y, Jacobsen KX, Lara García D, Flores-Gracia C, Crespo-Ramírez M, Gallegos-Cari A, Nuche-Bricaire A, Fuxe K. Role of the amygdaloid cholecystokinin

(CCK)/gastrin-2 receptors and terminal networks in the modulation of anxiety in the rat. Effects of CCK-4 and CCK-8S on anxiety-like behavior and [<sup>3</sup>H]GABA release. *Eur J Neurosci.* 2007; 26: 3614-3630.

Pérez de la Mora M, Lara García D, Jacobsen KX, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C, Escamilla-Marvan, E Fuxe K. Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. *Eur J Neurosci.* 2006; 23: 2749-2759.

Pergentino D., Nobrega R. Neuroleptic-Like Properties of the Chloroform Extract of *Maytenus obtusifolia*. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(2): 224-225.

Polc P, Haefely W. Effects of intravenous kainic acid, N-methyl-D-aspartate, and (–)-nuciferine on the cat spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1977; 300(3): 199-203.

Prinsep MR, Blunt JW, Munro MH. New cytotoxic beta-carboline alkaloids from the marine bryozoan, *Cribricellina cribraria*. *J Nat Prod.* 1991; 54(4): 1068-1076.

Protais P, Arbaqui J, Bakkali E. Effects of various isoquinoline alkaloids on in vitro <sup>3</sup>H-Dopamine uptake by rat striatal synaptosomes. *J Nat Prod.* 1995; 58(110): 1475-1484.

Puglisi-Allegra S, Cabib S. The D2 dopamine receptor agonist LY171555 induces catalepsy in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 30: 765-768.

Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM, Levi G. Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979; 208: 195–220.

Redpath JB, Pleuvry BJ. Double-blind comparison of the respiratory and sedative effects of codeine phosphate and (+/-) glaucine phosphate in human volunteers. *Br J Pharmacol.* 1982; 14(4): 555-558.

Reis GM, Duarte ID. Involvement of chloride channel coupled GABA<sub>C</sub> receptors in the peripheral antinociceptive effect induced by GABA<sub>C</sub> receptor agonist cis-4-aminocrotonic acid. *Life Sci.* 2007; 80: 1268–1273.

Ribeiro RA, Leite JR. Nanteine alkaloid presents anticonvulsant effect on two classical animal models. *Phytomedicine.* 2003; 10: 563-568.

Rodgers RJ. Animal models of “anxiety”: where next? *Behav Pharmacol.* 1997; 8: 477-496.

Rommelspacher H, May T, Salewski B. Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur J Pharmacol.* 1994; 252(1): 51-59.

Rommelspacher H, Nanz C, Borbe HO, Fehske KJ, Müller WE, Wollert U. 1-Methyl-beta-carboline (harmaline), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1980; 314(1): 97-100.

Rovinskiĭ VI. Acute glaucine syndrome in the physician's practice: the clinical picture and potential danger. *Klin Med (Mosk).* 2006; 84(11): 68-70.

Rynn M, Puliafico A, Heleniak C, Rikhi P, Ghalib K, Vidair H. Advances in pharmacotherapy for pediatric anxiety disorders. *Depress Anxiety.* 2011; 28(1): 76-87.

Saitoh A, Hirose N, Yamada M, Yamada M, Nozaki C, Oka T, Kamei J. Changes in Emotional Behavior of Mice in the Hole-Board Test After Olfactory Bulbectomy. *J Pharmacol Sci.* 2006; 102: 377-386.

Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB. The catalepsy test: Its ups and downs. *Behav Neurosci.* 1988; 102: 748-759.

Sanberg PR, Pevsner J, Coyle, JT. Parametric influences on catalepsy. *Psychopharmacology.* 1984; 82: 406-408.

Sanberg PR. Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. *Nature.* 1980; 284: 472-473.

Shi F, Li Y. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032. *Biotechnol Lett.* 2011 Aug 9. [Epub ahead of print]

Shin JS, Kim KT, Lee MK. Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1998; 244(3): 161-164.

Shin JS, Lee JJ, Kim Y, Lee CK, Yun YP, Lee MK. Inhibitory effects of ethaverine, a homologue of papaverine, on dopamine content in PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24(1): 103-105.

Shoji N, Umeyama A, Saito N, Iuchi A, Takemoto T, Kajiwara A, Ohizumi Y. Asimilobine and lirinidine, serotonergic receptor antagonists, from *Nelumbo nucifera*. *J Nat Prod.* 1987; 50(4): 773-774.

Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoyer H, Adamiker D. Structure and subunit composition of (GABA) receptors. *Neurochem Int.* 1999; 34: 379-385.

Sigel E, Lüscher BP. A Closer Look at the High Affinity Benzodiazepine Binding Site on GABA(A) Receptors. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(2): 241-246.

Silvania MM, Macedo DS, Melo CT, Monteiro AP, Rodriguez AC. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2004; 56: 389-393.

- Skolnick P, Crawley JN, Glowa JR, Paul SM. beta-Carboline-induced anxiety states. *Psychopathology*. 1984; 17(3): 52-60.
- Smart TG. Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. *Curr Opin Neurobiol*. 1997; 7(3): 358-367.
- Smith GB, Olsen RW. Functional domains of GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16: 162-168.
- Sonnet PE, Jacobson M. Tumor inhibitors. II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *J Pharm Sci*. 1971; 60(8): 1254-1256.
- Sotníková R, Kettmann V, Kostálová D, Táborská E. Relaxant properties of some aporphine alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1997; 19(9): 589-597.
- Standley PC, Steyermark JA. 1946–1976. Flora de Guatemala. *Fieldiana Botany*. 24 (4): 270 –294.
- Strange PG. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int*. 1993; 22(3): 223–236.
- Sugimoto Y, Furutani S, Itoh A, Tanahashi T, Nakajima H, Oshiro H, Sun S, Yamada J. Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system. *Phytomedicine*. 2008; 15: 1117–1124.
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998; 350: 21–29.
- Thomsen C, Ebert B. (2002). Modulators of the GABAA receptor complex: Novel therapeutic aspects. In “Glutamate and GABA Receptors and Transporters: Structure, Function and Pharmacology” (J. Egebjerg, A. Schousboe, and P. Krosgaard Larsen, Eds.), pp. 407–427. Taylor & Francis, London.
- Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993; 44(2): 463-469.
- Tse SY, Mak IT, Dickens BF. Antioxidative properties of harmaline and beta-carboline alkaloids. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42(3): 459-464.
- Vacher CM, Bettler B. GABAB Receptors as Potential Therapeutic Targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003; 2: 248-259.
- Valiente M, Ocon PD, Noguera MA, Cassels BK, Lugnier C, Ivorra MD. Vascular Activity of (-)-Annonaine, (-)-Roemerine and (-)-Pukateine, three Natural 6a(R)-1,2-Methylenedioxyaporphines with Different Affinities for alpha1-adrenoceptor Subtypes. *Planta Med*. 2004; 70: 603-609.

- Villar A, Mares M, Rios JL, Canton E, Gobernado M. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids. *Pharmazie*. 1987; 42(4): 248-50.
- Villar del Fresno AM. Anti-microbial properties of the leaves of *Annona cherimola* Mill. *Plant Med Phytother*. 1983; 17(4): 230-235.
- Wanibuchi F, Usuda, S. Synergistic effect between D1 and D2 dopamine antagonists on catalepsy in rats. *Psychopharmacology*. 1990; 102: 339-342.
- Warthen D, Gooden EL, Jacobson M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. *J Pharm Sci*. 1969; 58(5): 637-638.
- Wevers RA, de Rijk-van Andel JF, Brautigam C. A review of biochemical and molecular genetic aspects of tyrosine hydroxylase deficiency including a novel mutation (291delC). *J Inherit Metab Dis*. 1999; 22: 364-373.
- Whiting PJ. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes in the brain: A paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today*. 2003; 8: 445–450.
- Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC 3rd. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol*. 2003; 54 (6): S3-12.
- Woo SH, Reynolds MC, Sun NJ, Cassady FM, Snapku RM. Inhibition of Topoisomerase II by Lyriodenine. *Biochem Pharmacol*. 1997; 54: 467-473.
- Zetler G. Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1988; 296: 255-281.
- Zhelyazkova-Savova MD. Effect of isoteoline in a test for detecting anxiolytic activity in mice. *Eksper. Klin. Farmakol*. 1998; 61:19-21.
- Zhelyazkova-Savova MD, Zhelyazkov DK. Behavioural evidence of agonist-like effect of isoteoline at 5-HT<sub>1B</sub> serotonergic receptors in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2003; 55: 125–129.
- Zigmond RE, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR. Acute regulation of tyrosine Hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci*. 1989; 12: 415-461.