



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR
GABA / BZD EN EL EFECTO COMO ANSÍOLITICO DE β -
SITOSTEROL AISLADO DE *Tilia americana* var. *mexicana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

JOVITA MARGARITA JIMENEZ PAEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA EVA AGUIRRE HERNANDEZ

2013





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.

Datos del alumno

Jimenez

Paez

Jovita Margarita

15470290

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

086238247

Datos del tutor

Dra.

Eva

Aguirre

Hernández

Sinodal 1

Dr.

René de Jesús

Cárdenas

Vázquez

Sinodal 2

Dra.

Susana

Valencia

Avalos

Sinodal 3

Dra.

Ana Laura

Martínez

Martínez

Sinodal 4

Q.A.

Verónica

Muñoz

Ocotero

Dedicatorias

A mi esposo Saúl por su apoyo y comprensión.

A mis hijos Edwin y Mitzi por su cariño y paciencia.

A mi mamá y hermanos por estar conmigo

Al gran Ángel que me cuida desde el cielo, gracias papá.

A mis amigos que estuvieron conmigo durante mi realización académica, por sus experiencias compartidas, Elsa, Martha, Helena, Héctor y a mi gran amiga de toda la vida Magdalena y a todos aquellos amigos y compañeros de la carrera que entraron en mi vida por algún motivo.

GRACIAS.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber. Albert Einstein

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me brindaron su apoyo para la realización de este trabajo ya que no lo realice sola, quiero agradecer principalmente a mi directora de tesis la Dra. Eva Aguirre Hernández por las asesorías brindadas y su gran paciencia.

Al laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencia por brindarme las instalaciones para la realización de mi trabajo

A la Dra. Patricia Guevara Fefer, Dra. Josefina Herrera Santoyo por su apoyo brindado y por las amenas charlas.

M. en C. Enrique Llanos Romero por su asesoría en la realización de las gráficas.

M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz por su apoyo brindado.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo, en especial, a la Dra. Ma. Eva González Trujano por su disposición y apoyo otorgado para la finalización de este trabajo y al grupo de buena gente que tuve la oportunidad de conocer.

Doy las gracias al personal académico de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado para la realización de este proyecto. Asimismo, agradezco la asesoría técnica proporcionada por el Dr. Enrique Pinzón Estrada y el Dr. Ismael Torres Saldaña

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, a las Doctoras Susana Valencia Avalos y Ana Laura Martínez Martínez y a la Q.A. Verónica Muños Ocotero por sus sugerencias y el tiempo brindado en la revisión de este manuscrito.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. BOTÁNICA	3
2.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO TILIA L.....	3
2.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	4
2.1.3. DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO TILIA	4
2.2. ETNOBOTÁNICA.....	5
2.3. QUÍMICA.....	5
2.3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN EL GÉNERO TILIA	5
2.3.2. FARMACOLOGÍA Y PRINCIPIOS ACTIVOS DE TILIA AMERICANA VAR. MEXICANA.....	6
2.4. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	7
2.4.1. NEURONAS.....	8
2.4.2. SINAPSIS.....	9
2.4.2.1. MECANISMOS DE EXCITACIÓN E INHIBICIÓN SINÁPTICA	10
2.4.3. NEUROTRANSMISORES	11
2.4.4. ÁCIDO GAMMA-AMINO BUTÍRICO (GABA).....	13
2.4.4.1. SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE GABA.....	14
2.4.4.2. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR GABAA.....	15
2.5. ENFERMEDADES DEL SNC.....	16
2.5.1. LA ANSIEDAD COMO UNA ALTERACIÓN DEL SNC.....	16
2.5.2. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGIA DE LA ANSIEDAD	17
2.5.3. PRINCIPALES TRASTORNOS DE LA ANSIEDAD.....	17
2.5.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS BENZODIACEPINAS	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVO E HIPÓTESIS	21
4.1. OBJETIVOS.....	21
4.2. HIPÓTESIS.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
5.2. IDENTIFICACIÓN Y PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL.....	23
5.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	23
5.4. OBTENCIÓN DEL B-SITOSTEROL.....	23
5.5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	23
5.6. PREPARACIÓN DEL B-SITOSTEROL Y FÁRMACOS.....	24
5.7. POTENCIACIÓN DE LA HIPNOSIS INDUCIDA POR PENTOBARBITAL SÓDICO (PS).....	24

5.7.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MOTORA (CAMPO ABIERTO).....	25
5.7.2 EFECTO ANSIOLÍTICO Y/O SEDANTE.....	25
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. AISLAMIENTO DEL B-SITOSTEROL.....	28
6.2.1. CURVA DOSIS RESPUESTA DEL B-SITOSTEROL EN EL MODELO DE POTENCIACIÓN DE LA HIPNOSIS INDUCIDA POR PENTOBARBITAL SÓDICO.	29
6.2.2. EFECTO ANSIOLÍTICO Y ACTIVIDAD EXPLORATORIA.	31
6.2.3. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GABAA/BDZ EN EL EFECTO ANSIOLÍTICO DE B-SITOSTEROL.....	33
7. DISCUSION.....	36
8. CONCLUSIONES.....	38
9. REFERENCIAS.....	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	6
Cuadro 2. Principales neurotransmisores.....	14
Cuadro 3. Síntomas del trastorno de ansiedad.....	18
Cuadro 4. B-sitosterol aislado del extracto hexánico de inflorescencias de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inflorescencias de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	4
Figura 2. Organización del Sistema Nervioso.....	8
Figura 3. Partes de la neurona.....	9
Figura 4. Sinapsis química.....	12
Figura 5. La sinapsis GABAérgicas.....	16
Figura 6. Diseño experimental.....	27
Figura 7. Potenciación de la hipnosis inducida por PS.....	29
Figura 8. Modelo de la actividad motora.....	30
Figura 9. Modelo de cruz elevada.....	31
Figura 10. Modelo de tablero con orificios.....	32
Figura 11. Modelo cilindro de exploración.....	32
Figura 12. Identificación del β –sitosterol por cromatografía en capa fina.....	34
Figura 13. Evaluación de la duración de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico.....	35
Figura 14. Evaluación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico con bicuculina, diazepam y flumazenil.....	36
Figura 15. Evaluación del efecto ansiolítico y de la actividad exploratoria de bicuculina, diazepam y flumazenil.....	37

ABREVIATURAS

Ac	Acido
ANADEVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BDZ	Benzodizepinas
Bicu	Bicuculina
CCF	Cromatografía en capa fina
Cm	Centímetros
DH	Duración de la hipnosis
DZP	Diazepam
FMZ	Flumazenil
g	Gramos
GABA	Ácido gama amino butírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramos
LH	Latencia a la hipnosis
LS	Latencia a la sedación
m	Metros
MAO	Mono amino-oxidasa
mg	Miligramos
min	Minuto
mv	Mili volts
PS	Pentobarbital sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TEPT	Trastorno por estrés traumático
TOC	Trastorno obsesivo compulsivo
var.	Variedad

RESUMEN

A nivel mundial, especies del género *Tilia* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades tranquilizantes. En México *Tilia americana* var. *mexicana* es conocida con los nombres comunes de “cirimbo”, “flor de tila”, “sirimo”, “tirimo”, “jonote” y “tila de hoja”. De esta especie se han aislado e identificado compuestos como el β -sitosterol, kaempferol, quercetina y glicósidos de flavonoides. Asimismo, se ha evaluado el efecto ansiolítico y sedante de extractos orgánicos, acuosos y compuestos puros. También se conoce la acción de varios flavonoides con afinidad a receptores benzodiazepínicos, pero poco se sabe del efecto ansiolítico del triterpeno β -sitosterol y mucho menos de su mecanismo de acción. Es por ello, que el presente trabajo tuvo como finalidad realizar la evaluación del efecto ansiolítico del β -sitosterol y analizar su posible mecanismo de acción mediante la participación del receptor $GABA_A$ /BDZ. Para la obtención del β -sitosterol, se realizó una cromatografía en columna del extracto hexánico y su identificación se hizo mediante la determinación del punto de fusión y cromatografía en capa fina en comparación con el estándar. El β -sitosterol se evaluó en tres modelos de ansiedad en ratones: cruz elevada (plus-maze), tablero con orificios (hole-board) y cilindro de exploración. La valoración farmacológica del β -sitosterol mostró que éste produce un efecto ansiolítico significativo en dosis de 5-20 mg/kg y un efecto sedante en dosis de 30 mg/kg. El tratamiento de diazepam flumazenil y bicuculina receptor de $GABA_A$ / Benzodiazepina con y β -sitosterol mostraron una disminución en la actividad exploratoria en brazos abiertos en comparación con la administración del β -sitosterol solo. Con respecto a los otros modelos, no se observa un efecto significativo en el número de exploraciones en el tablero con orificios ni en el número de levantamientos, en el tratamiento de β -sitosterol con diazepam se observa una disminución en la actividad en el modelo de brazos abierto. Estos resultados muestran que el efecto ansiolítico del β -sitosterol está relacionado con la participación de receptor $GABA_A$ /BDZ

1. INTRODUCCIÓN

Desde los tiempos más remotos de la historia de la humanidad, la medicina siempre ha sido considerada la ciencia principal. El uso de las plantas medicinales ha estado presente desde el inicio en la práctica curativa. Las plantas medicinales son todas aquellas que contienen uno o más principios activos, los cuales, administrados con la dosis adecuada producen un efecto curativo de las enfermedades en el hombre y los animales. El hecho de contener más de un principio activo hace que una planta medicinal pueda servir para tratar diferentes afecciones o trastornos. Los productos naturales con propiedades terapéuticas han sido muy utilizados en la medicina, muchos tienen como soporte su uso tradicional, sin que existan datos que científicamente demuestren su utilidad, puesto que solo en años recientes algunos se han evaluado siguiendo una sólida metodología científica. Sin duda, los extractos de plantas son una de las fuentes de mayor interés para la obtención de fitofármacos. (Hall et al, 2001).

De las plantas más utilizadas sobresalen aquellas cuyas propiedades curativas se aplican a enfermedades neurológicas, especialmente de tipo degenerativo, reconociéndose a la ansiedad, la depresión, la epilepsia y el dolor como las que más aquejan a la población. A pesar de ello el porcentaje de especies estudiada desde un punto de vista fitoquímico es bajo y es menor aun el número de aquellas evaluadas farmacológicamente para garantizar que el uso que se les da es el adecuado y no presentan riesgos para la salud (Martínez, 2005). En México el uso de las plantas medicinales data desde la época prehispánica, y en la actualidad es una práctica común pero sin sustento científico (Linares et al, 1995)

Los trastornos de ansiedad son los más prevalentes y crónicos en la población mexicana, con un porcentaje aproximado de 13 al 15% (Constantino-Casas et al., 2010). Los tratamientos con benzodiazepinas y otros fármacos son costosos y además, éstos conllevan a problemas colaterales como náuseas, vómitos, sedación y dependencia. Por ello surge la necesidad del uso de nuevas alternativas terapéuticas; tal es el caso de la medicina herbolaria que ha resultado efectiva en el tratamiento de los trastornos de ansiedad, depresivos y demenciales (Wong et al, 1998).

Una de las ventajas del uso de fitofármacos (extractos) es que no tienden a causar adicción, dependencia física o psicológica, ni síndrome de abstinencia con la misma intensidad que un compuesto puro. Esto se atribuye al sinergismo entre la actividad de los componentes activos (Heinze y Ontiveros, 1998).

Tilia americana var. mexicana, conocida comúnmente como “tila”, “tilia”, “zirimo”, entre otros, es utilizada para, aliviar cólicos menstruales, resfriados, inflamaciones

musculares, vomito, tos, epilepsia, tensión nerviosa y estrés (Martínez, 1969; Estrada, 1985; Aguilar et al., 1994; Argueta et al., 1994). En estudios fitoquímicos de *Tilia americana* var mexicana se han aislado principalmente ácidos grasos, el triterpeno β - sitosterol y flavonoides como la quercetina, el canferol y varios de sus glicósidos. A la presencia de estos flavonoides se les atribuye la actividad ansiolítica que posee esta especie (Aguirre-Hernández et al., 2009)

El β -sitosterol es un triterpeno sintetizado en las plantas, con una estructura similar al colesterol y responsable en parte de ciertas actividades biológicas, tales como: antiinflamatoria y anticancerígena, así como su participación en la disminución de los niveles de colesterol en la sangre (Pelletier et al., 1995; Villaseñor et al., 2002; Awad et al., 2003; Delporte et al., 2005). Con respecto a su efecto sobre el sistema nervioso central se menciona su actividad ansiolítica y sedante (Aguirre-Hernández et al., 2007), pero se desconoce aún su mecanismo de acción. Es por ello, que en el presente trabajo se describe el efecto ansiolítico y sedante del β -sitosterol y su posible mecanismo de acción con la participación del receptor GABA_A/BDZ.

2. ANTECEDENTES

2.1. Botánica

2.1.1. Descripción botánica del género *Tilia* L.

Desde el año 1837, el botánico alemán Schlechtendal hizo una descripción botánica de *Tilia mexicana* basada en ejemplares colectados en Chiconquiaco, Veracruz (Bush, 1929). Las tilias son árboles grandes de madera blanca, corteza lisa, que alcanza los 30 m de altura y presenta un follaje vistoso. Hojas con láminas ovadas, oblongo-lanceoladas o elípticas, 5-nervadas, con pubescencia de tricomas simples y estrellados, de consistencia papirácea, ápice acuminado, margen aserrado o dentado-mucronado, base cordado, obtusa u oblicua; estipulas caducas. Inflorescencias dispuestas en cimas terminales o axilares, pedunculadas, acompañada por una bráctea foliácea, membranácea, oblonga. Cáliz con 5 sépalos ligeramente cuculados en botón, libres verdes, ovados, pubescencia, con ápice acuminado; corola con 5 pétalos, libres, blancos o amarillos, glabros; estambres numerosos, connados en la base; filamentos simples; anteras dorsifijas, con cinco estaminodios, petaloides; gineceo 5-carpelar; ovario globoso, 5-locular, con pubescencia de tricomas simples y estrellados, 2 óvulos por lóbulo, estigma 5-lobado, placentación axilar. Fruto una nuez globosa, densamente estrellado-pubescente; pedicelo estrellado-pubescente. Semilla una o dos por lóculo, ovoides negras. Número cromosómico $2n=82$ (Hardin, 1990)



Figura 1. Inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana*

2.1.2. Clasificación taxonómica

En el reino vegetal se calcula que existen cerca de 250,000 especies de plantas superiores, de las cuales las angiospermas comprenden aproximadamente 415 familias y 59 ordenes (APG III, 2009). La clase magnoliopsida (eudicotiledónea) está representada por 165,000 especies de hierbas, arbustos, y árboles. La subclase Dilleniidae comprende 13 órdenes, 78 familias y cerca de 25,000 especies e incluye al orden Malvales que abarca 5 familias y 3,500 especies; en este orden se ubica la familia Tiliaceae, con aproximadamente 50 géneros y 450 especies (Cronquis, 1988), que alberga al género de *Tilia* con 50 especies.

Bush (1929) reportó 15 especies de *Tilia* en México (*T. ambigua*, *T. arsenei*, *T. coahuilana*, *T. floridana*, *T. houghi*, *T. longipes*, *T. mexicana*, *T. moreliana*, *T. nelsoni*, *T. occidentalis*, *T. pertomentosa*, *T. pringle*, *T. roseana*, *T. rotunda*, y *T. sargentiana*.) considerando características morfológicas de la hoja como son: forma y tamaño de la lámina, longitud del pecíolo, tipo de base, margen, ápice y variación de la pubescencia.

Jones (1968), con base en diferencias en la cantidad y tipo de pubescencia en el envés de la hoja, agrupa a todas las *Tilias* mexicanas en una sola especie: *Tilia mexicana*.

Posteriormente, Hardin (1990), reduce el número de especies de Estados Unidos y México a solamente una: *Tilia americana* con cuatro variedades (*americana*, *heterophylla*, *caroliniana*, y *mexicana*). por lo tanto, únicamente *Tilia americana* L var. *mexicana* es reconocida para México. Hardin considera que las características morfológicas vegetativas presentan una alta plasticidad fenotípica como una respuesta a factores del ambiente. Por ello su clasificación se basa en la morfología de tricomas, ya que dicha morfología está controlada genéticamente, y por ello proporciona la mejor evidencia para reorganizar los taxa. De esta forma actualmente se considera que el género *Tilia* está conformado por 24 especies, de las cuales 17 se distribuyen en Asia, 6 en Europa y 1 en Norteamérica (Tang y Zhuage, 1996).

2.1.3. Distribución del género *Tilia*

El género *Tilia* consta de un número de alrededor de 25 a 80 especies, se distribuye en Europa, Asia, Siberia Occidental, América del Norte y México.

Tilia americana var. *mexicana* se distribuye en 16 estados de México, abarca al Norte los estados de Chihuahua y Coahuila y al sur Guerrero y Oaxaca. Esta especie crece en bosque mesófilo de montaña, el cual constituye aproximadamente el 0.5 % del territorio mexicano (Rzedowski, 1978).

2.2. Etnobotánica

A nivel mundial la familia Tiliaceae ha sido utilizada en la herbolaria, la infusión de las flores es usada como sedante, antiespasmódico, diaforético, anticitarral, diurético y antirreumático (Volák y Stodola, 1990; Wichtl, 2004).

En México, *Tilia americana* var. *mexicana* es utilizada para aliviar cólicos menstruales, resfriados, epilepsia, inflamaciones musculares, vomito, tos, fiebre, insuficiencia renal, insomnio y calmar los nervios. Esta planta es utilizada con frecuencia en los estados del centro de la República Mexicana como Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Martínez 1969; Estrada 1985; Aguilar et al., 1994; Argueta et al., 1994). En Jalapa, Ver. la infusión de flores de tilia es usada para tratar la enterocolitis, gastroenteritis, hemorroides, cólicos hepáticos y nefríticos, dolores por vejiga inflamada y problemas del corazón (Pavón, 2000; Monroy-Ortiz et al., 2007).

Tilia americana var. *mexicana* tiene varios nombres comunes de acuerdo a la región. En Michoacán y Jalisco se le conoce como “cirimo”, “tila”, “tilia”. En Oaxaca, se le llama “yaca” y “yaco”, finalmente en Morelos e Hidalgo se le conoce como “tilia” (Martínez, 1979).

2.3. Química

2.3.1. Metabolitos secundarios presentes en el género *Tilia*

En inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* se han aislado e identificado ácidos grasos, terpenoides y flavonoides (Cuadro 1)

Cuadro 1. Metabolitos secundarios identificados en *Tilia americana* var. *mexicana*

Grupo de metabolitos secundarios	Compuesto	Referencia
Ácidos grasos	Ácido palmítico	Aguirre-Hernández et al., 2007
Terpenoides	β -sitosterol	Aguirre-Hernández et al., 2007
Flavonoides	Quercetina-3,7-O-dirramnósido, kaenferol-3,7-O-dirramnósido quercetina-3-O-glucósido (isoquercitrina), kaenferol-3-O-glucósido (astragalina), kaempferol 3-O- (6-p-coumaril)-glucósido (tilirósido), kaenferol-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-ramnósido (quercitrina), quercetina-3-O- rutinósido (rutina).	Herrera-Ruiz et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2008; Aguirre-Hernández et al., 2010

2.3.2. Farmacología y principios activos de *Tilia americana* var. *mexicana*

En México, la infusión de las inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* es utilizada para diversos fines terapéuticos, pues poseen actividades ansiolíticas, sedantes, antiespasmódicas, diuréticas y estomáticas. Dichas propiedades medicinales se asociación con la presencia de principios activos como los terpenoides y flavonoides (Aguirre-Hernández et al., 2007; 2010; Herrera-Ruiz et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2008). Aguirre-Hernández et al. (2007) mencionan por primera vez el efecto ansiolítico y sedante del β -sitosterol, triterpeno aislado del extracto hexánico de *Tilia americana* var. *mexicana*. Pérez-Ortega et al. (2008) reportan que el extracto acuoso de inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* potencia el sueño en ratones en el modelo de potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico, lo cual indica un efecto hipnótico en el que está implicado el neurotransmisor GABA. También dicho extracto posee un efecto ansiolítico similar al producido por el diazepam. Asimismo, Herrera-Ruiz et al. (2008) menciona el efecto ansiolítico y sedante de una mezcla de flavonoides obtenida del extracto metanólico de *Tilia*. Por otro lado se reporta la actividad ansiolítica de la quercetina y el kaenferol (Aguirre-Hernández et al., 2010).

2.4. Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso humano se compone de dos subsistemas principales: sistema nervioso central SNC y sistema nervioso periférico SNP. El SNC está formado por el encéfalo y médula espinal los cuales integran y correlacionan diversos tipos de información sensorial, además es la fuente de pensamientos, emociones y recuerdos (Fig.2)

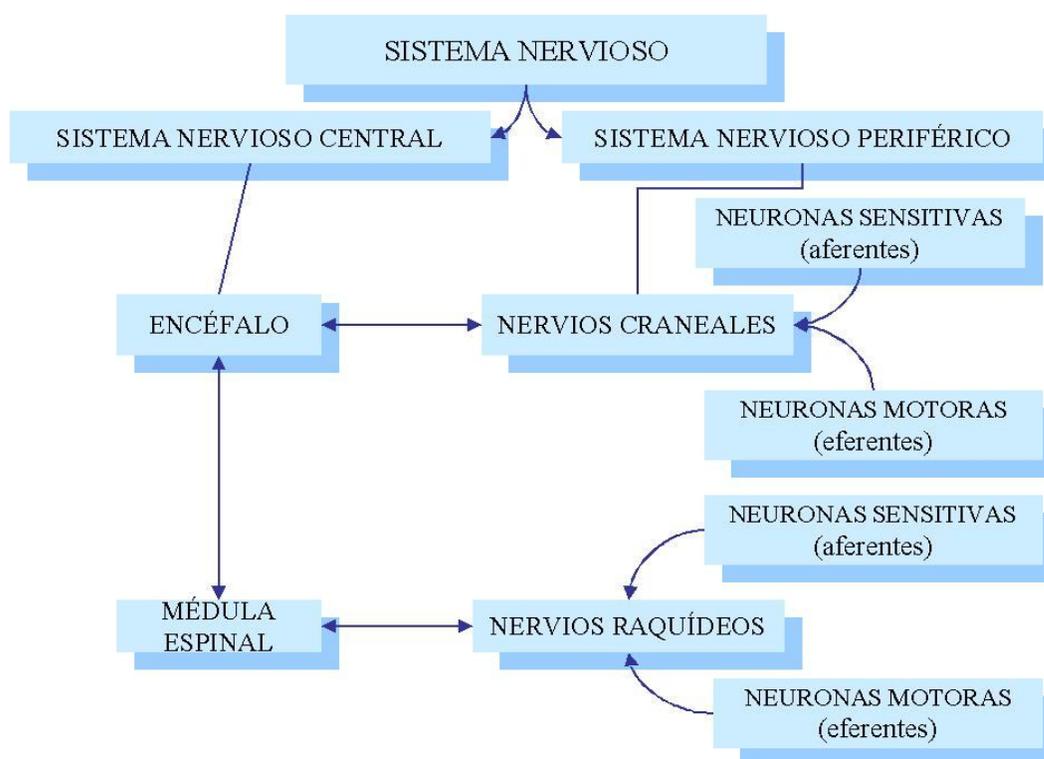


Figura 2. Organización del Sistema Nervioso (Deutsch, 1993)

El sistema nervioso periférico (SNP) está constituido por nervios craneales, nervios espinales o raquídeos y ganglios. De estos existe la división sensitiva (neuronas aferentes) y la división motora (neuronas eferentes). La división sensitiva informa al sistema nervioso de lo que pasa dentro del cuerpo, y la división motora es la responsable de enviar información del sistema nervioso central a los distintos efectores del cuerpo como respuesta a la información procedente de la división sensitiva (Deutsch, 1993).

2.4.1. Neuronas

Las neuronas son, de todas las células excitables del organismo, las que poseen la capacidad de comunicación más rápida. El cambio informativo entre las neuronas se realiza a nivel de una unión especializada denominada sinapsis

El sistema nervioso está formado por más 100 000 millones de neuronas y son las que transmiten señales a todo el organismo. El tejido nervioso está constituido por dos tipos de células: neuronas y neuroglías. Las neuronas son las unidades funcionales del sistema nervioso central y participan en funciones como: pensar sentir, movimiento, etc. Las células gliales proporcionan sostén, nutrición y protección a las neuronas (Snell, 1992) Las neuronas están constituidas por tres partes principales, 1) cuerpo celular (soma), 2) dendritas y 3) axón (Figura 3).

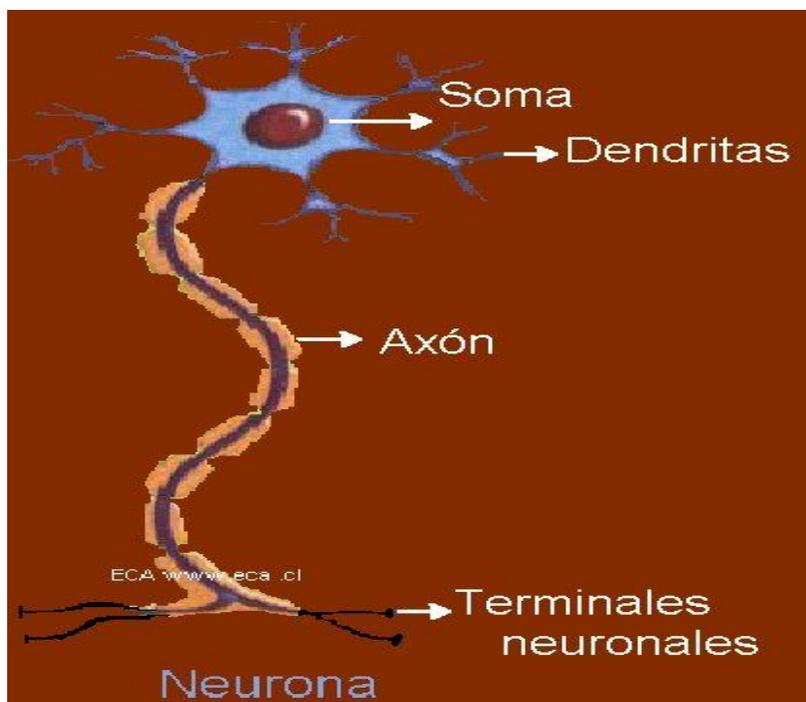


Figura 3. Partes constitutivas de una neurona (Snell 1992)

Las neuronas se clasifican funcionalmente en tres tipos:

1. Neuronas sensoriales o aferentes. Son las que recogen mensajes de los órganos sensoriales y los transmiten a la médula espinal o al el encéfalo.
2. Neuronas motoras: Son aquellas que llevan mensajes de la médula espinal y el encéfalo a los músculos y glándulas.

3. Interneuronas o neuronas de asociación. Son las que transmiten mensajes de una neurona a otra (Liguarda, 1992)

2.4.2. Sinapsis

La información en el SNC es transmitida bajo la forma de potenciales nerviosos (impulsos nerviosos) que pasan uno tras otro por una serie de neuronas. La sinapsis o articulación interneuronal, es un sitio de interacción entre dos células especializadas para la transmisión del impulso nervioso y sus componentes son: superficie presináptica, la cual conduce el impulso nervioso; espacio sináptico, lugar donde se libera el neurotransmisor y la superficie postsináptica, quien recibe el impulso nervioso. En este lugar se abren los canales iónicos y los segundos mensajeros empiezan a funcionar dentro del cuerpo de la segunda neurona, desencadenando un impulso nervioso (Azcoaga 1981).

Una neurona ejerce su influencia para excitar a otras neuronas mediante los puntos de unión o sinapsis. Cada unión sináptica está formada por una parte de una neurona (terminal pre-sináptica) que conduce un impulso a la sinapsis y por otra neurona (estructura postsináptica) que recibe el impulso en la sinapsis (Barr, 1994). El impulso nervioso debe atravesar un espacio muy pequeño, ya sea una hendidura sináptica (química o unión gap) que separa las estructuras pre y postsináptica y puede propagarse en cualquier dirección por la superficie de la neurona. Sin embargo, la dirección que toma ésta determinada por una polarización constante que se hace en la sinapsis, donde la transmisión generalmente se efectúa del axón de una neurona a una dendrita de otra neurona (Nieto, 1991). Las sinapsis se clasifican en dos tipos, según la transmisión del impulso, en sinapsis química y sinapsis eléctrica.

Sinapsis eléctrica. En este tipo de sinapsis los procesos pre y postsináptico son continuos, debido a la unión citoplasmática por moléculas de proteínas tubulares a través de las cuales transita libremente el agua, pequeños iones y moléculas conectores (Barr,1994). Si hay despolarización y la dirección de la transmisión está determinada por la fluctuación de los potenciales de membrana de las células interconectadas los potenciales de acción que llegan terminal presináptica pasan a la posinaptica a través de los conectores despolarizándola, (Bradford, 1988).

Sinapsis química. La mayoría de las sinapsis que se utilizan para transmitir señales en el sistema nervioso central son químicas. En este tipo de sinapsis no hay continuidad estructural entre la membrana presináptica y postsináptica, por lo que el neurotransmisor actúa como puente entre las dos neuronas, difunde a través de la hendidura sináptica y se une a los receptores, que son moléculas especiales de proteínas que se encuentran en la membrana postsináptica

(Bradford,1988). La naturaleza del neurotransmisor y la molécula del receptor determina si el efecto producido será de excitación o inhibición de la neurona postsináptica (Barr, 1994).

2.4.2.1. Mecanismos de excitación e inhibición sináptica

En la sinapsis química las células están más separadas dejando un espacio entre ellas (espacio sináptico). La transmisión del impulso nervioso ocurre mediante la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico. El potencial de acción que llega a la terminal, provoca la entrada de calcio al medio intracelular. El aumento de calcio provoca que las vesículas que contienen los neurotransmisores se fusionen a la membrana plasmática de la terminal axónica exocitosis, esto produce la liberación de neurotransmisores hacia el espacio sináptico, estos se unen a receptores específicos que existen en la membrana postsináptica. Se activan los canales iónicos para desencadenar o no un potencial postsináptico que pueda favorecer o inhibir la formación de potencial de acción, (Agranoff, et al., 1999).

Dependiendo del tipo de canal iónico activado, la sinapsis puede ser excitatoria o inhibitoria. Si el neurotransmisor al unirse al receptor provoca la apertura de los canales de sodio cierre de los canales de K^+ (despolarización), genera un potencial postsináptico excitador. En la sinapsis inhibitoria, los neurotransmisores abren canales de cloro y/o potasio. Si abren canales de potasio, sale potasio al medio extracelular. Si abren canales de cloro, entra cloro al interior de la neurona. En ambos casos se genera una hiperpolarización. Esta hiperpolarización genera un potencial postsináptico inhibitorio. Provoca la detención de la transmisión del impulso nervioso o reducción de la frecuencia de potenciales de acción, (Agranoff, et al., 1999).

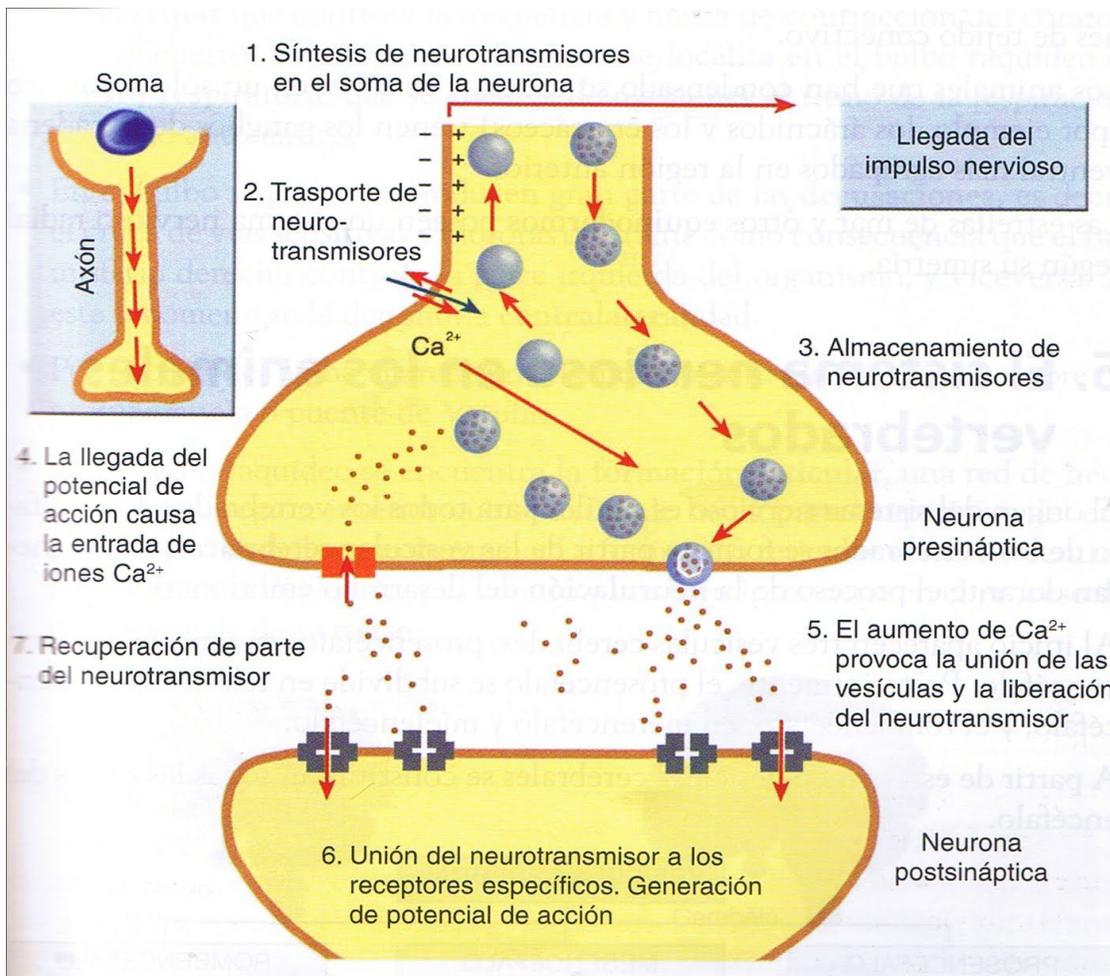


Figura 4. Sinapsis química

2.4.3. Neurotransmisores

Un neurotransmisor es una sustancia que lleva mensajes entre diferentes células nerviosas o entre células nerviosas y músculos; capaz de alterar el funcionamiento de otra célula de manera breve o duradera, por medio de la ocupación de receptores específicos y por la activación de mecanismos iónicos y/o metabólicos.

Los neurotransmisores excitadores desencadenan un impulso nervioso en la célula receptora, mientras que los neurotransmisores inhibitorios evitan o disminuyen la transmisión de un impulso (Schwartz, 2000). Para que una molécula sea considerada como neurotransmisor debe reunir los siguientes criterios:

- 1) ser sintetizado en la neurona
- 2) estar almacenado en la terminal presináptica y ser liberado cuando recibe estímulos en cantidades suficientes y ejercer una acción postsináptica.
- 3) cuando se libera debe tener acción del neurotransmisor hacia el receptor
- 4) inactivación del neurotransmisor una vez que ha concluido su efecto (Schwartz, 2000).

Los neurotransmisores más comunes se enlistan en el cuadro 2:

Cuadro 2. Principales neurotransmisores

Neurotransmisor	Localización	Función
Aminas Acetilcolina	Sinapsis con músculos y glándulas; varias partes del sistema nervioso central	Excitatorio o inhibitorio Relacionado con la memoria
Serotonina	Varias regiones del sistema nervioso central	Mayormente inhibitorio. Función sobre el sueño y alertamiento. Implicado en estados de ánimo y emociones
Histamina	Encéfalo	Mayormente excitatorio. Interviene en las emociones, regulación de la temperatura y balance de agua
Dopamina	Encéfalo y sistema nervioso autónomo	Mayormente inhibitorio. Regula las emociones (ánimo y la actividad motriz)
Epinefrina	Áreas del sistema nervioso central y división simpática del sistema nervioso autónomo	Excitatorio o inhibitorio
Norepinefrina	Áreas del sistema nervioso central y división simpática del sistema nervioso autónomo	Excitatorio o inhibitorio; regula respuestas emocionales
Aminoácidos Glutamato	Sistema nervioso central	Neurotransmisor excitatorio
GABA	Encéfalo	Neurotransmisor inhibitorio
Glicina	Médula espinal	Neurotransmisor inhibitorio
Neuropéptidos Péptido intestinal vasoactivo	Encéfalo; algunas fibras del sistema nervioso autónomo y sensoriales	Función en el sistema nervioso incierta
Colecistoquinina	Encéfalo y retina	Función en el sistema nervioso incierta
Sustancia P	Encéfalo, médula espinal, rutas sensoriales de dolor, tracto gastrointestinal	Mayormente excitatorio. Involucrado en las sensaciones de dolor
Encefalinas	Varias regiones del sistema nervioso central, retina y tracto intestinal	Mayormente inhibitorias. Actúan como opiáceos para bloquear el dolor
Endorfinas	Varias regiones del sistema nervioso central, retina y tracto intestinal	Mayormente inhibitorias. Actúan como opiáceos para bloquear el dolor

Fuente: Bustamante 2004

4.4. Ácido gamma-amino butírico (GABA)

Los aminoácidos están entre los neurotransmisores más abundantes en el SNC. El ácido gama-amino butírico (GABA) y glutamato regulan la actividad de varias neuronas en el cerebro; GABA como inhibidor y glutamato como excitador, por lo tanto, están implicados en importantes procesos fisiológicos así como patofisiológicos.

La inhibición está mediada por GABA por lo cual su estudio ha adquirido importancia creciente por su rol en la génesis de la ansiedad y otras alteraciones psiquiátricas. GABA se encuentra en todo el cerebro, pero su mayor concentración está en el cerebelo. Las neuronas GABAérgicas están localizadas en la corteza, hipocampo y las estructuras límbicas.

La acción de las neuronas GABAérgicas es importante en neuropsiquiatría porque un gran número de ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivantes ejercen su acción farmacológica al actuar sobre sus receptores (Bustamante, 2004).

2.4.4.1. Síntesis y degradación de GABA.

GABA es sintetizado a partir de la descarboxilación de glutamato, mediada por la enzima glutamato descarboxilasa. Una vez sintetizado, el GABA es introducido en vesículas y está listo para salir de la neurona presináptica. Cuando se produce el estímulo nervioso, GABA es liberado de la neurona presináptica y llega hasta la neurona postsináptica donde es reconocido por los receptores GABA_A y GABA_B. El GABA que no interacciona con los receptores es recapturado por la célula presináptica. Una vez allí, mediante la GABA transaminasa es degradado a semialdehído succínico que lo convierte a succinato (Figura 3). La GAD se halla en interneuronas, riñón, hígado, páncreas, ganglios autónomos, epífisis e hipófisis.

El receptor GABA_A situado en la membrana plasmática de la terminal post sináptica es la que se relaciona con los receptores de las benzodiazepinas (BZD). Por su parte, los receptores GABA_B y GABA_C ubicados en la membrana plasmática de las terminales pre y post sinápticas no tienen relación con los receptores benzodiazepínicos. Los receptores GABA_A abren canales de cloro, por lo tanto, son inhibidores de la conducción del impulso nervioso. Los receptores GABA_B, producen ya sea inhibición de los canales de calcio (inhibidor presináptico) o activación de los canales de K⁺ (inhibidor postsináptico). Aunque GABA reconoce ambos tipos de receptores, existen agonistas de GABA que sólo reconocen uno de los dos. Los receptores GABA_C consisten de un canal para los iones cloruro, que provocan la hiperpolarización de la membrana.

Actualmente se ha logrado determinar que los receptores GABA_A contienen múltiples isoformas. Asimismo, se ha sugerido que los múltiples receptores GABA_B son responsables de varias funciones metabotrópicas en el cerebro para la transmisión inhibitoria gracias a su acoplamiento con proteínas G ligando GTP (trifosfato de guanocina) (Brailowsky, 1998).

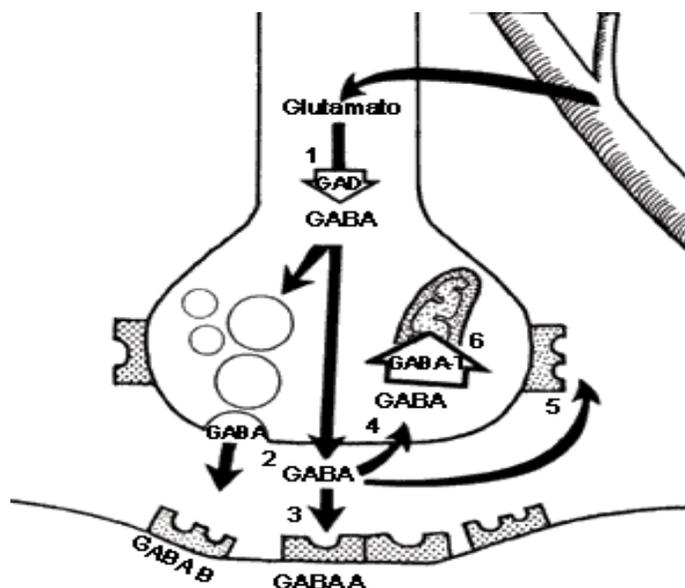


Figura 5 .La sinapsis GABAérgicas

Una vez sintetizado GABA (1), éste puede liberarse hacia el espacio sináptico directamente o desde almacenes vesiculares (2), fuera de la terminal, GABA puede ocupar receptores postsináptico (3) (GABA_A y GABA_B).

El aminoácido puede recapturarse (4), o metabolizarse por la transaminasa del GABA (6) (Brailowsky, 1998).

2.4.4.2. Estructura del receptor GABA_A

Es un complejo oligomérico que tiene los siguientes sitios:

- Sitio para el canal iónico que es un canal de cloro.
- Sitios alostéricos adicionales de unión de fármacos: benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, zinc y etanol.

- Sitio del agonista endógeno GABA, donde se une el ligando endógeno GABA, modulado por las fármacos que se unen a los sitios alostéricos adicionales.
- Sitio de reconocimiento de baja afinidad preferentemente antagonizado por las benzodiazepinas.
- Sitio de reconocimiento de alta afinidad que es una forma desensibilizada del receptor.
- Sitio de las BZD, las cuales aumentan la unión del GABA con el sitio de reconocimiento del receptor GABA_A.
- Sitio de los agonistas inversos, reducen el flujo de cloro inducido por GABA: beta carbolinas.
- Sitio de los agonistas parciales, poseen afinidad y actividad menor que el agonista total: ciclopirrolonas.
- Sitio del coagonista, es inhibitorio: glicina.
- Sitio de los antagonistas selectivos: bicuculina
- Sitio de los antagonistas no selectivos. Tienen afinidad pero su actividad es nula, no influyendo sobre el canal de cloro, pero si antagonizan las acciones de los agonistas: flumazenil (Bouton 2001).

2.5. Enfermedades del SNC

De las enfermedades del SNC, la ansiedad, la depresión, la epilepsia y el dolor son las que más aquejan a la población.

2.5.1. La ansiedad como una alteración del SNC

La ansiedad es una emoción natural, presente en todos los humanos, que resulta muy adaptativa pues nos pone en alerta ante una posible amenaza; sin embargo, a veces se vive como una experiencia desagradable (emoción negativa), cuando sobrepasa el umbral emocional se vuelve patológica e interfiere de manera negativa en las actividades cotidianas de quienes la padecen (Bouton, 2001).

Los trastornos de ansiedad se caracterizan por generar cambios motores como irritabilidad, actitudes agresivas, vigilancia exacerbada y reacciones emocionales exageradas ante una situación de peligro (Cuadro 3). Todos estos síntomas son persistentes a través del tiempo e independientes de los estímulos externos que lo provocan, especialmente cuando alcanza una elevada intensidad, que se refleja en fuertes cambios somáticos. Además, esta reacción, cuando es muy intensa, puede provocar una pérdida de control sobre nuestra conducta normal (Kaplan, 2002).

Cuadro 3. Síntomas del trastorno de la ansiedad

Síntoma	Características
Síntomas cognitivos	Preocupación injustificada ,inseguridad, perdida de la confianza en uno mismo, sentimientos de inferioridad, problemas de concentración
Síntomas motores	Tartamudeo y dificultad en la comunicación verbal, movimientos torpes, hiperactividad, aislamiento social,
Síntomas psicofisiológicos	Temblores, fatiga, tensión muscular, dolor de cabeza, sequedad de boca, sudoración excesiva, mareos, palpitaciones, pulso acelerado, e incremento de la tensión arterial, molestias gastrointestinales, náuseas, vómitos, sofoco, y respiración rápida.

Fuente: Nathan et al., 2002.

2.5.2. Clasificación y epidemiología de la ansiedad

La ansiedad es un trastorno con alta prevalencia en la población general (12.5 a 15 %), se presenta ya sea como entidad primaria o acompañada de otras afecciones psíquicas o somáticas. Constituye una respuesta del sistema nervioso a estímulos externos o alteraciones endógenas cerebrales, que se traducen en síntomas somáticos y psicológicos (Constantino-Casas et al., 2010).

En un estudio sobre trastornos mentales, obtenidos de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México, se observó que una de cada cinco personas presenta al menos un trastorno mental en un momento de su vida. Los trastornos de ansiedad resultaron ser los más prevalentes y crónicos. Los trastornos individuales más comunes fueron la depresión mayor, la fobia específica y la fobia social. Las ciudades de México, Guadalajara y Monterrey mostraron la prevalencia más elevada de trastornos de ansiedad (3.4%) (Medina-Mora et al., 2003).

2.5.3. Principales trastornos de la ansiedad

La Clasificación Internacional de Enfermedades divide los trastornos de ansiedad en ansiedad fóbica (agorafobia, fobia social y específica) y otros como pánico; ansiedad generalizada, mixto ansioso depresivo, obsesivo compulsivo; reacciones a estrés grave; trastornos de adaptación, disociativos, somatomorfos y otros de tipo neurótico:

- **Trastorno por crisis de angustia.** Aparición temporal y aislada de miedo o malestar intensos, acompañada de 4 o más síntomas que se inician

bruscamente, como sudoración, temblores o sacudidas, sensación de ahogo, náuseas o molestias abdominales.

- **Agorafobia.** Aparición de ansiedad al encontrarse en lugares o situaciones donde escapar le resulta difícil, miedo a viajar en autobús, avión, tren (Constantino-Casas et al., 2010).
- **Trastornos fóbicos.** Fobia social, se define como el temor causado por una o más situaciones sociales en público, en las cuales el individuo se ve expuesto frente a personas que no pertenecen al entorno íntimo. Esta persona teme actuar por miedo a ser humillado o avergonzado.
- **Trastorno por ansiedad generalizada.** Ansiedad y preocupación exagerada la mayor parte del tiempo, estado persistente de miedo y aprensión durante al menos seis meses. Presenta síntomas como tensión muscular, fatiga, inquietud, mala concentración, irritabilidad y problemas de sueño
- **Trastorno obsesivo compulsivo (TOC).** Obsesiones persistentes y recurrentes e impulsos (comportamiento repetitivo en respuesta a obsesiones). Las obsesiones suelen acompañar cada acto de la vida, causando gran malestar e insidia (Carrión et al., 2001).

2.5.5. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas

Las benzodiazepinas son ansiolíticas a dosis bajas e hipnóticas a dosis elevadas, con un inicio de acción rápido. Estos fármacos actúan potenciando la acción inhibitoria del neurotransmisor GABA, que directa o indirectamente inhibe la entrada de Ca^{2+} , aumenta la conductancia al K^+ y la permeabilidad del cloro que hiperpolariza la neurona y disminuye su excitabilidad. Las benzodiazepinas se combinan con los lugares reguladores de GABA, facilitando la unión de este neurotransmisor (Dodman, 1999).

El mensaje que GABA transmite es un mensaje de inhibición, le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir. Alrededor del 40% de los millones de neuronas del cerebro responden al GABA, esto significa que GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro, de cierta forma, es el hipnótico y tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las benzodiazepinas aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional (frecuentemente excesiva) de inhibición en las neuronas. La forma en que el GABA transmite su mensaje inhibitorio es a través de lo que podríamos llamar un inteligente dispositivo electrónico. Su reacción con los sitios especiales (receptores GABA) ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las

partículas con carga negativa (iones de cloruro) entren en la neurona. Estos iones negativos hiperpolariza la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que, en condiciones normales, la excitarían. Las benzodiazepinas también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una benzodiazepina con su receptor potencia la acción del GABA, lo cual permite que entre en las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, el alfa 1, es el responsable de los efectos sedativos, otro el alfa 2 es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el alfa 1 y el alfa 2, como también el alfa 5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las benzodiazepinas se combinan, en mayor o menor grado, con todos estos subtipos y aumentan la actividad del GABA en el cerebro (Ashton, 2002).

Como resultado de este incremento de la actividad inhibitoria del GABA causada por las benzodiazepinas, disminuye la producción cerebral de neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina y dopamina. Estos neurotransmisores excitatorios son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea. Estas funciones pueden ser perjudicadas por las benzodiazepinas. Existen otros receptores benzodiazepínicos, no relacionados con el GABA, que se encuentran en el riñón, colon, células sanguíneas y corteza suprarrenal, y que pueden ser afectados por algunas benzodiazepinas. Estos efectos directos e indirectos son responsables de los efectos adversos causados por el uso de las benzodiazepinas (Ashton, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, enfermedades como la ansiedad y la depresión, ocupan uno de los primeros lugares de padecimientos del SNC. El interés actual en la búsqueda de compuestos activos aislados de plantas medicinales está en relación con la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de estos trastornos.

En estudios previos, se demostró que el triterpeno β -sitosterol aislado de *Tilia americana* L. var. *mexicana* produce un efecto ansiolítico en diferentes modelos experimentales de ansiedad en ratones (Aguirre-Hernández et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo de acción responsable de dicho efecto no se ha descrito. Existen reportes que indican que productos naturales como los flavonoides ejercen su efecto ansiolítico debido a su unión a receptores GABA_A/BDZ; sin embargo, poco se conoce acerca del mecanismo de acción relacionado con el efecto ansiolítico de los triterpenos. Es por esta razón que el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto ansiolítico de β -sitosterol en ratones así como evaluar la participación del receptor GABA_A/BDZ en su mecanismo de acción.

4. OBJETIVO E HIPÓTESIS

4.1. Objetivos

Objetivo general

Analizar la participación del receptor GABA_A/BDZ como mecanismo de acción del efecto ansiolítico de β -sitosterol

Objetivos particulares

- 1.- Aislar y purificar el β -sitosterol del extracto hexánico de *T. americana* var. *mexicana* mediante cromatografía en columna
- 2.- Evaluar el efecto ansiolítico y sedante del β -sitosterol mediante el uso de tres modelos experimentales (cruz elevada, tablero con orificios y cilindro)
- 3.- Demostrar el efecto depresor de β -sitosterol en el SNC mediante el modelo de potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico

4.2. Hipótesis

El efecto ansiolítico del β -sitosterol es mediado a través del receptor GABA_A/BDZ.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Diseño Experimental

En la figura 6. Se ilustra la secuencia experimental realizada para lograr los objetivos.

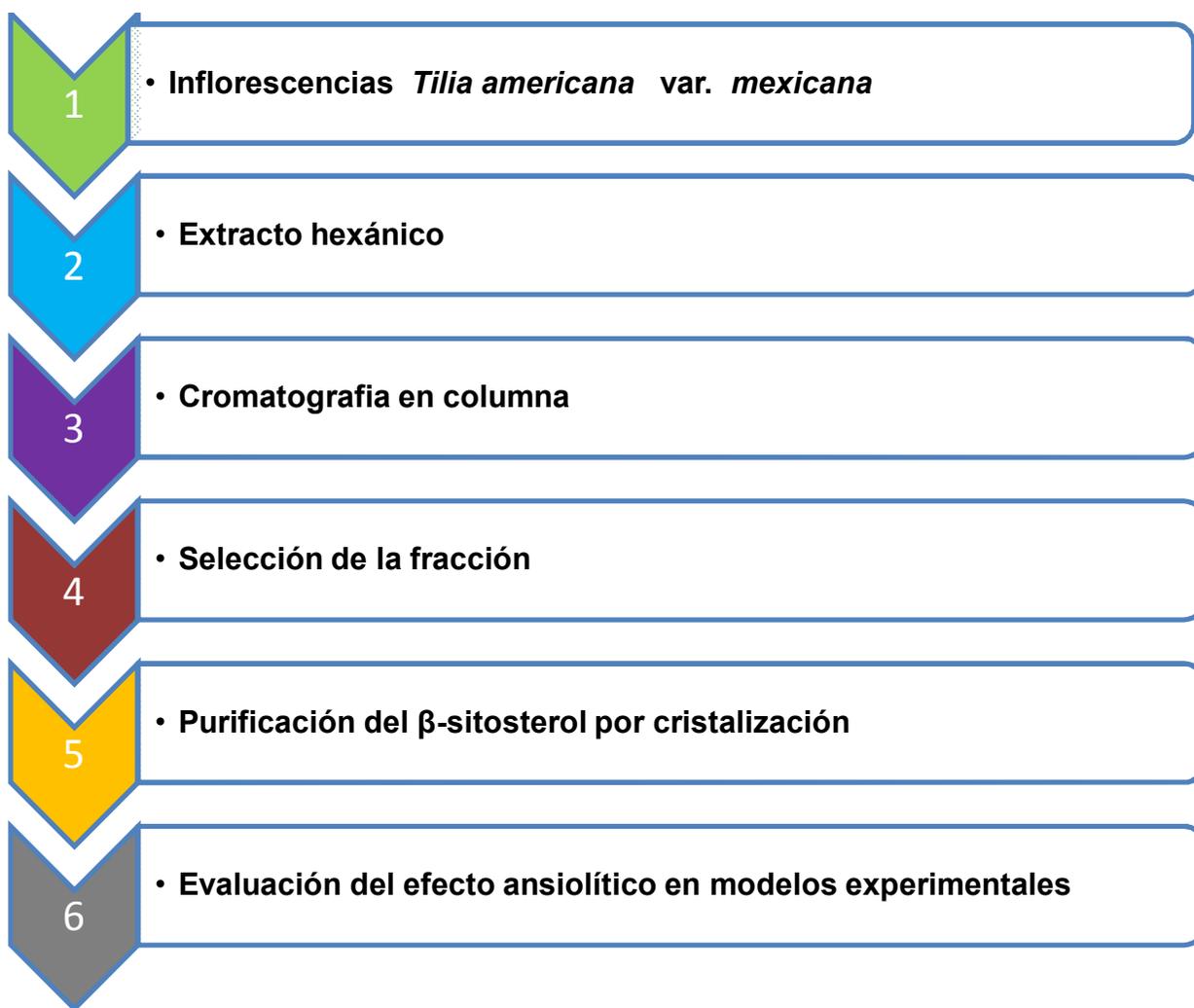


Figura. 6 .pasos experimentales en el orden preciso para la obtención de resultados.

5.2. Identificación y procesado del material vegetal

Las inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* se colectaron en el poblado de Honey, Puebla a 1 km de la cabecera municipal de Honey, el 5 de junio de 2011. El sitio se localiza en los paralelos 20°12'32" y 18°20'48" latitud norte y los meridianos 98°11'18" y 98°17'42" longitud oeste. A una altitud de 2100 m. Un ejemplar se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias, con número de registro 131613.

5.3. Extracto hexánico

Las inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* (1.2 kg), se secaron a temperatura ambiente y se molieron finamente. El polvo de las inflorescencias se sometió a cuatro extracciones sucesivas mediante maceración con hexano durante 8 horas cada una. El disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida para la obtención del extracto.

5.4. Obtención del β -sitosterol

El extracto hexánico (115 g) se separó por cromatografía en columna convencional sobre gel de sílice, utilizando como disolvente hexano y polaridad creciente con acetato de etilo, hasta eluir con acetato de etilo y posteriormente con metanol. Las fracciones de 100 ml se colectaron en matraces y se concentraron mediante destilación a presión reducida. Por cromatografía en capa fina se visualizó la complejidad y pureza de cada fracción, permitiendo reunir las fracciones semejantes.

Algunas fracciones se obtuvieron con cierto grado de pureza y en buena cantidad por lo que se purificaron por cristalización con hexano-acetato de etilo. Su identificación se realizó mediante la determinación del punto de fusión y cromatografía en capa fina en comparación con el estándar de β -sitosterol marca sigma con una pureza de 90%.

EVALUACION FARMACOLÓGICA

5.5. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos CD-1, con un peso corporal de 25-30 g. Los sujetos experimentales se colocaran en cajas de acrílico en grupos de al menos seis, mantenidos a una temperatura controlada de 22°C con ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h con libre acceso al alimento y al agua (ad libitum)

5.6. Preparación del β -sitosterol y fármacos

El β -sitosterol y el diazepam (fármaco de referencia, Valium Roche) se resuspendieron con tween 80 al 0.5% en solución salina al 0.9%. El pentobarbital (Sedal Vet^R), el flumazenil y la bicuculina se diluyeron con solución salina 0.9%. El diazepam, el flumazenil y la bicuculina se evaluaron a los 30 min después de su administración. Las dosis del β -sitosterol a evaluar fueron de 5, 10, 20, 30 mg/kg para obtener una curva dosis-respuesta. La dosis de 10 mg/kg fue la elegida para evaluar el mecanismo de acción. La dosis del flumazenil utilizada fue de 2.5 mg/kg, y la bicuculina 0.2mg/kg. Todos los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.).

5.7. Evaluación farmacológica

5.7.1. Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico (PS)

Se administro β -sitosterol (5-30mg/kg), una hora después los a animales recibieron una dosis de 42 mg/kg de Pentobarbital Sódico para después registrar la latencia de sedación, latencia de hipnosis y duración de la hipnosis (González-Trujano et al., 1998) (Fig. 7).



Figura 7. Potenciación de la hipnosis inducida por Pentobarbital Sódico

5.7.2. Evaluación de la actividad motora (campo abierto).

La prueba consiste en colocar individualmente a los ratones en una caja de acrílico con 12 divisiones (cuadrados de 6 x 6 cm) y registrar durante 2 minutos el número de cuadros explorados por cada ratón (Fig. 8).



Figura 8. Modelo de actividad motora

5.7.3. Efecto ansiolítico y/o sedante

Para evaluar el efecto ansiolítico y/o sedante se utilizarán los siguientes modelos experimentales:

1. Modelo de cruz elevada (plus-maze)

Este aparato está hecho de madera y consta de una cruz elevada con dos brazos abiertos de 30 x 5 cm y dos brazos cerrados de 30 x 5 x 15 cm. Dichos brazos se extienden a partir de una plataforma central de 5 x 5 y se encuentran elevados a 50 cm del suelo. Los ratones son colocados en la parte central y se cuenta el número de entradas y el tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos ó cerrados durante 5 minutos. La exploración incrementada en los brazos abiertos es indicativo del efecto ansiolítico (Lister, 1987) (Fig. 9)



Figura 9. Modelo de cruz elevada

2. El modelo del tablero con orificios (hole-board)

Este modelo consiste de una caja de acrílico con un tablero de madera con orificios distribuidos uniformemente. Los ratones son colocados sobre el tablero y se cuenta el número de veces que los animales introducen su cabeza en los orificios durante un periodo de tres minutos. Una disminución en el número de exploraciones será indicativa de efectos sedantes y/o ansiolíticos (Fig.10).



Figura 10. Modelo de tablero con orificios

3. Modelo de exploración en cilindro

En esta prueba el ratón es colocado dentro de un cilindro de vidrio (20 cm de altura x 13 cm de diámetro x 5 mm de grosor) y se cuenta el número de veces que el animal se levanta sobre sus extremidades posteriores apoyando sus extremidades anteriores en la pared del cilindro durante un periodo de 5 minutos (Hiller y Zetler, 1996). (Fig. 11).



Figura 11. Modelo de Exploración en cilindro

5.8. Análisis estadístico

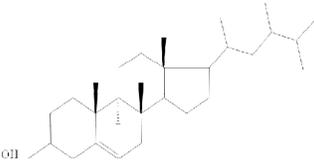
El análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza (ANADEVA) seguido de la prueba de Dunnett en la comparación de los tratamientos contra el control. Se utilizó el programa Sigma Stat versión 3.5.

6. RESULTADOS

6.1. Aislamiento del β -sitosterol

El fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico permitió la obtención de 103 fracciones de 100 ml cada una, las cuales se reunieron según su similitud mostrada en los perfiles desarrollados mediante la composición en cromatografía en capa fina. De la combinación de las fracciones 24-36 se aisló un sólido blanco, el cual se cristalizó de hexano-acetato de etilo. Por medio del punto de fusión y del R_f en comparación con el estándar se identificó como β -sitosterol, previamente reportado en la literatura Aguirre-Hernández et al., 2007 (Cuadro 4. Fig. 12)

Cuadro 4. β -sitosterol aislado del extracto hexánico de inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana*.

NÚMERO DE FRACCIÓN	DISOLVENTE DE ELUCIÓN	COMPUESTO	ASPECTO	CANTIDAD (mg)	PUNTO DE FUSIÓN
24-36	Hexano/acetato de etilo 7:3	β -sitosterol 	Sólido blanco	61.5	135 °C



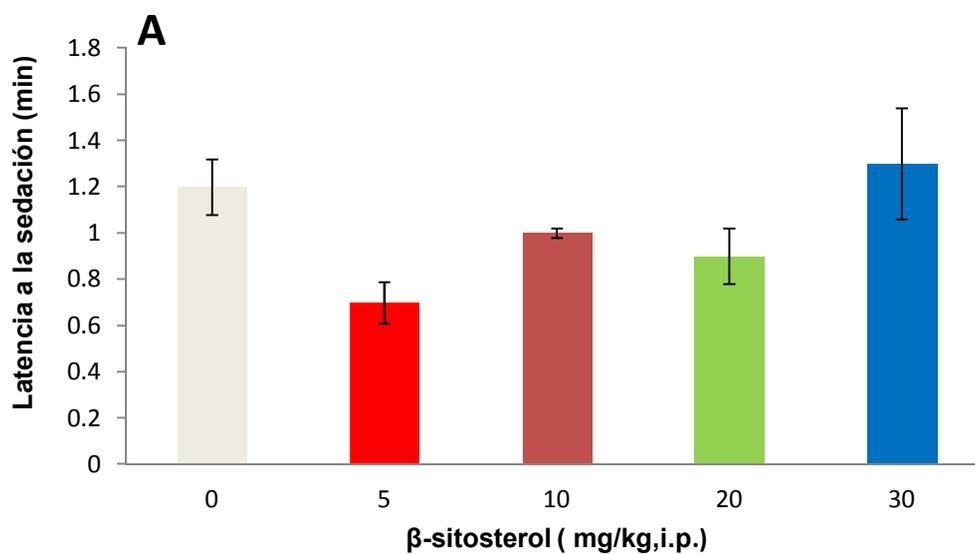
1 2

Figura 12. Identificación del β -sitosterol por cromatografía en capa fina: (1) compuesto aislado del extracto hexánico y (2) estándar. Placa con una fase estacionaria de silica gel y fase móvil de hexano-acetato 7:3 v/v, revelada con el reactivo de anisaldehído.

6.2. EVALUACION FARMACOLÓGICA

6.2.1. Curva dosis respuesta del β -sitosterol en el modelo de potenciación de la hipnosis inducida por Pentobarbital Sódico.

En la Fig. 13, A y B se observa que el β -sitosterol no modifica la latencia a la sedación, ni la latencia a la hipnosis. Sin embargo este compuesto (5-30 mg/kg) produce un incremento significativo en la duración de la hipnosis inducida por Pentobarbital Sódico con respecto al grupo control, (Fig. 13 C).



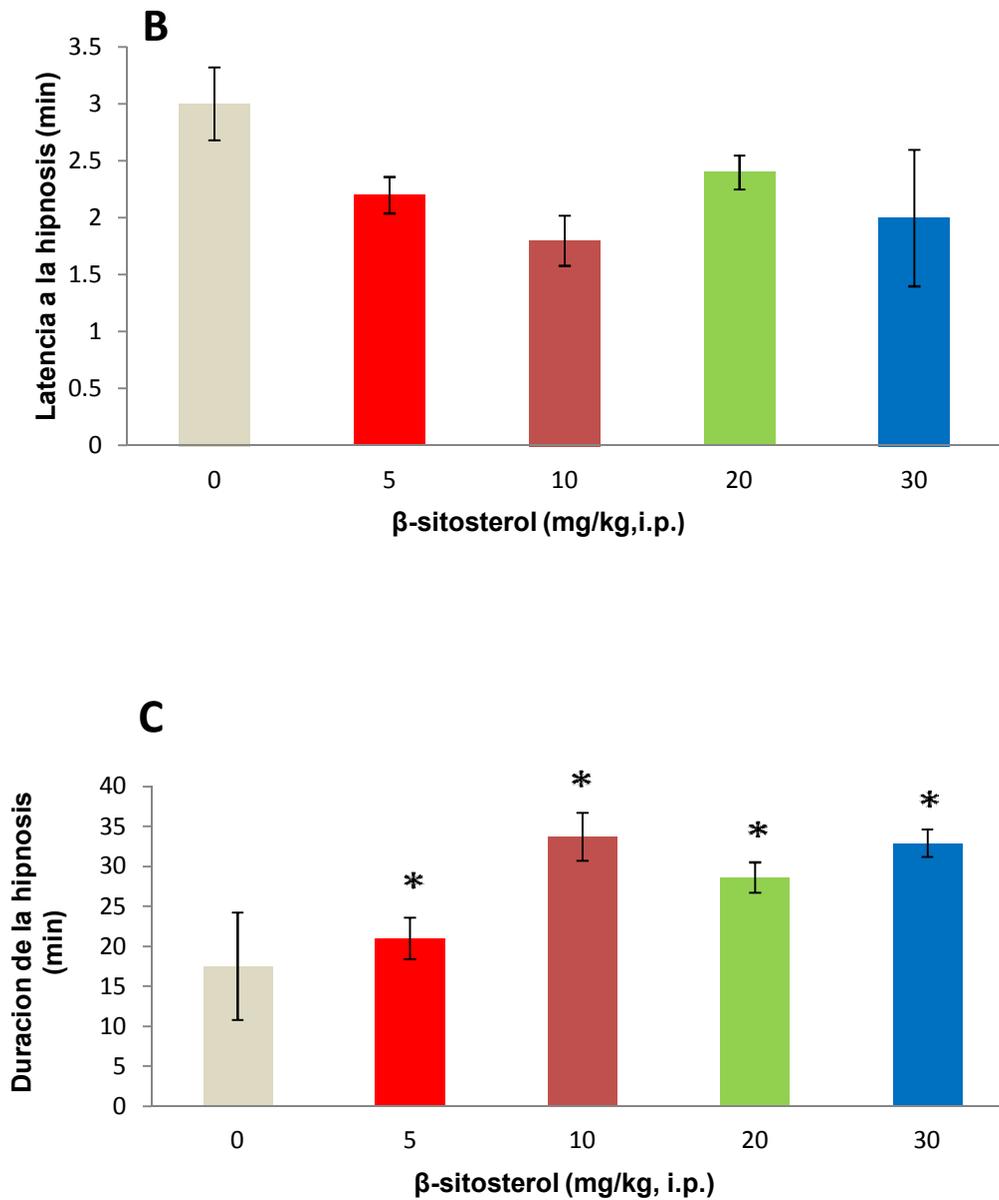
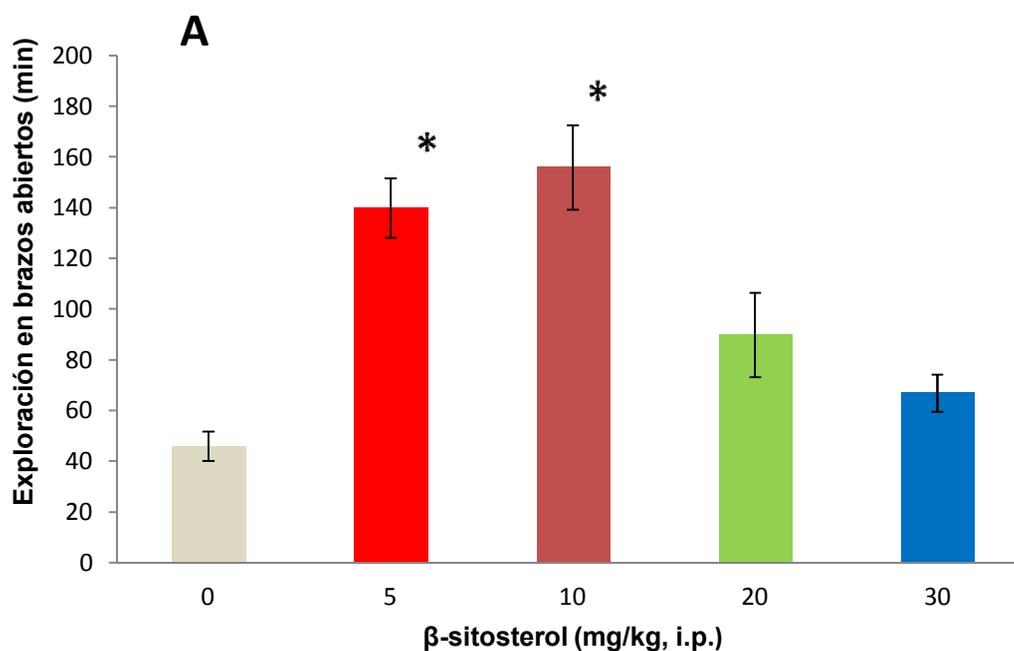


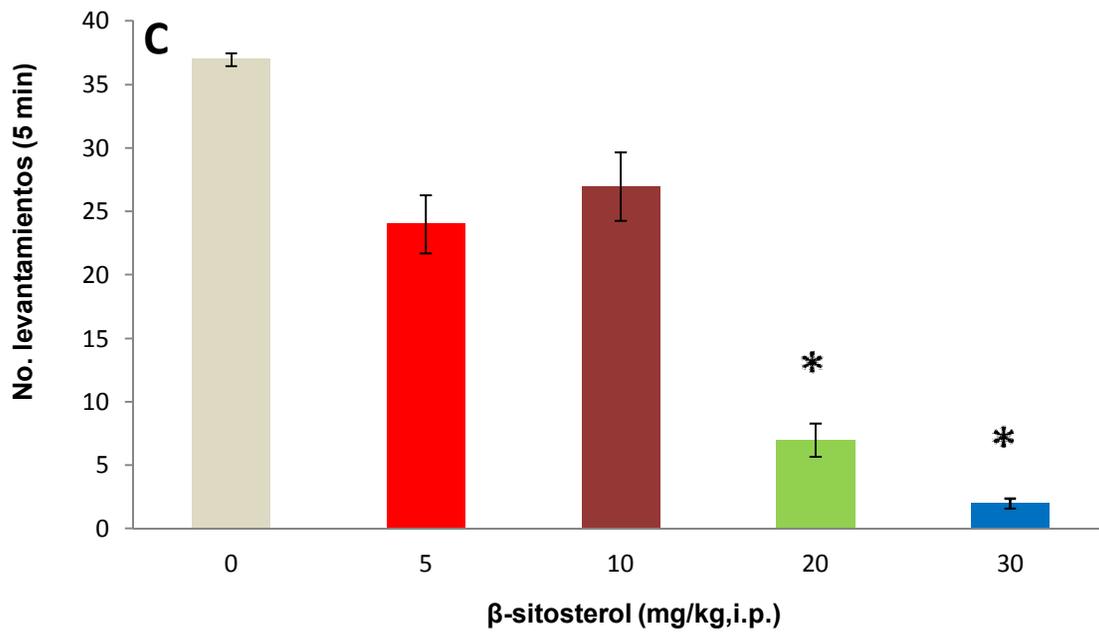
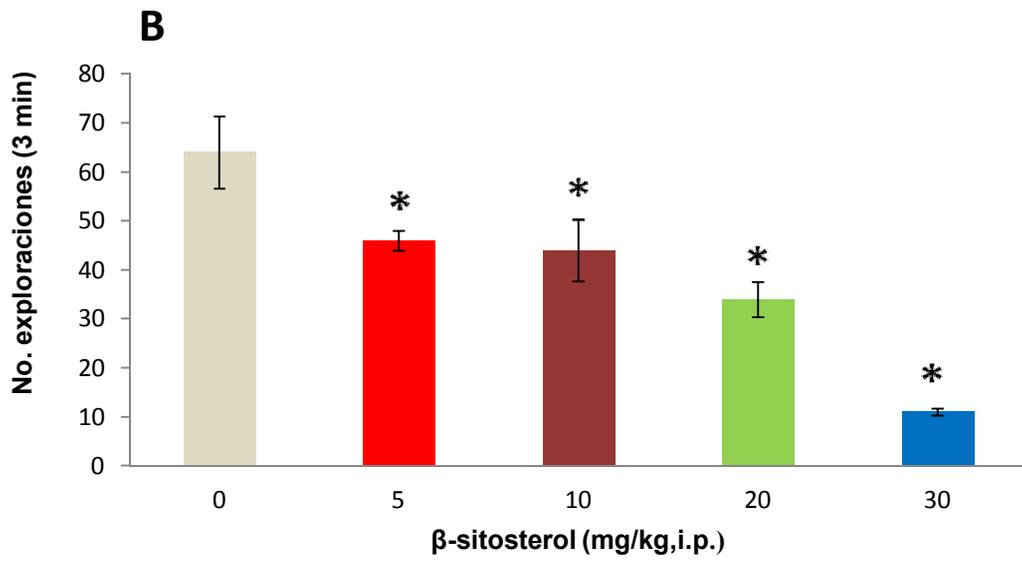
Figura 13. Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida por Pentobarbital Sódico (42 mg/kg, i.p.). En presencia de β -sitosterol. Latencia a la sedación (A), latencia a la hipnosis (B) y duración de la hipnosis (C). Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de seis animales. * $p < 0.05$, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

6.2.2. Efecto ansiolítico y actividad exploratoria.

En la Fig. 14 A se observa que la administración de β -sitosterol induce un incremento en el tiempo de exploración de los ratones en brazos abiertos en el laberinto de cruz elevada, siendo significativo a las dosis de 5 y 10 mg/kg, con respecto al modelo de tablero de orificios (Fig. 14 B) y el modelo de exploración en cilindro (Fig. 14 C) los ratones administrados con β -sitosterol mostraron una reducción significativa en la exploración en las dosis evaluadas. Los datos obtenidos en estos tres modelos experimentales sugieren que β -sitosterol posee actividad ansiolítica.

En el modelo de campo abierto, la administración de β -sitosterol produjo una disminución en la actividad motora en la dosis de 10 y 30 mg/kg, dicho efecto mayor a la dosis de 30 mg/kg (Fig.14D). Estos resultados sugieren que β -sitosterol también induce un efecto sedante.





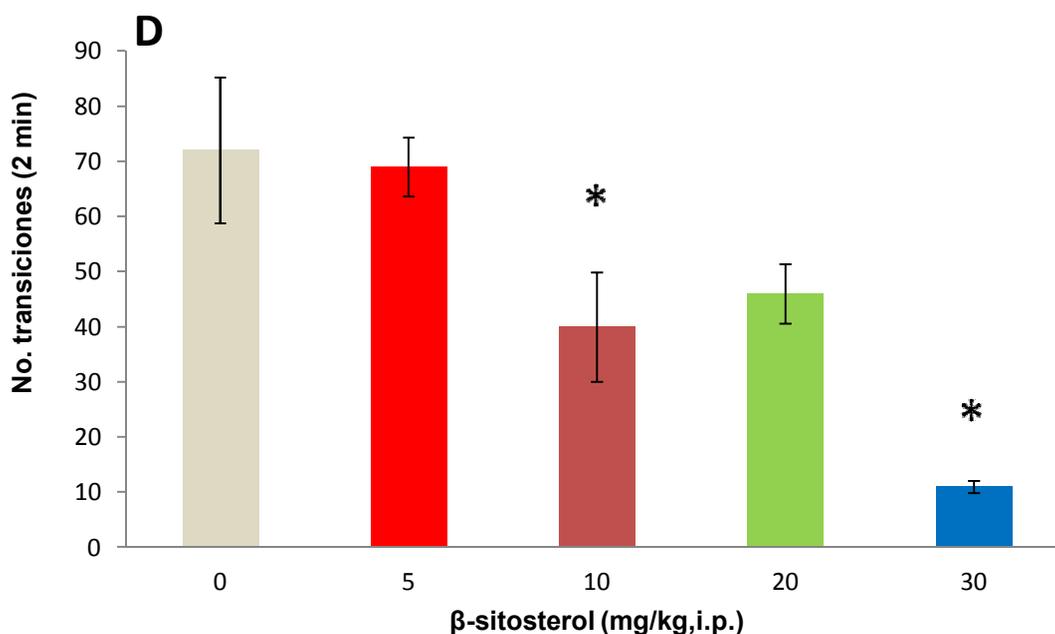
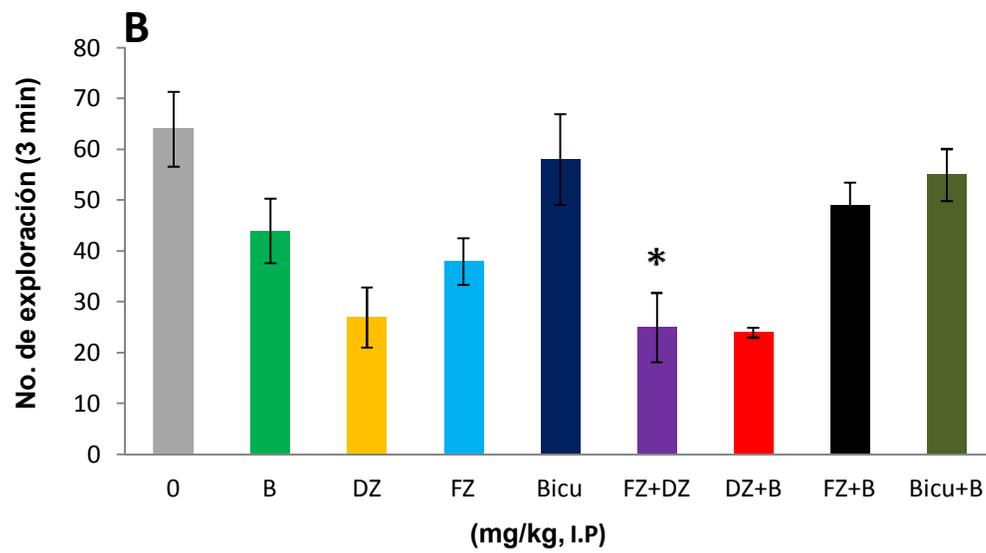
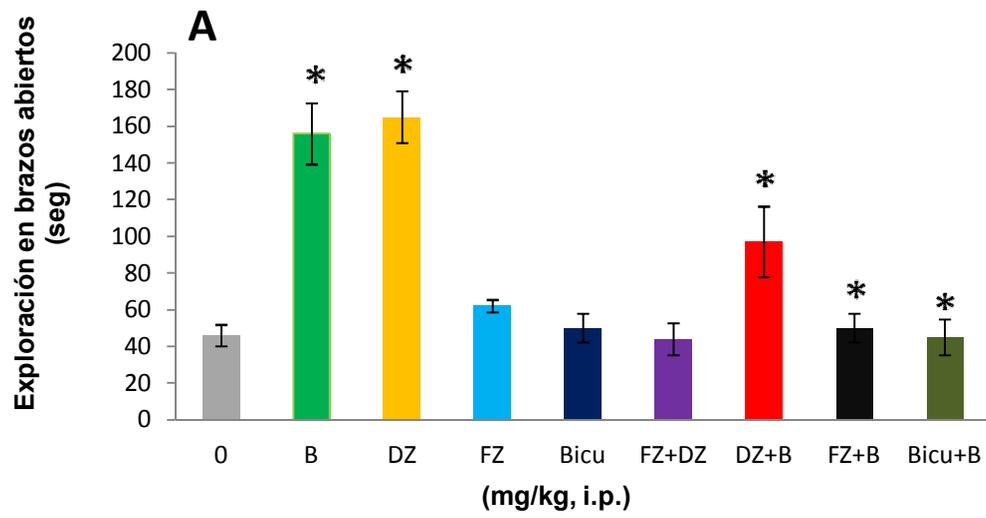


Figura 14. Evaluación del efecto ansiolítico y la actividad motora del β -sitosterol. Modelo de cruz elevada (A), tablero con orificios (B), cilindro (C) campo abierto (D). Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de seis animales * $p < 0.05$, ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett.

6.2.3. Análisis de la participación del receptor GABA_A/BDZ en el efecto ansiolítico de β -sitosterol.

La administración de 10 mg/kg de β -sitosterol produce un efecto ansiolítico en el modelo de cruz elevada. La dosis de 0.1 mg/kg de diazepam, (control positivo), induce un aumento en la exploración en brazos abiertos con respecto al grupo control. El pretratamiento con flumazenil y bicuculina bloquea el efecto ansiolítico inducido por β -sitosterol (antagonistas a receptores benzodiazepínicos). Además, la combinación de β -sitosterol y diazepam muestra una reducción en el efecto ansiolítico (Fig. 15 A). En contraste, en los otros modelos empleados no se observa una reducción significativa del efecto ansiolítico con el pretratamiento con bicuculina y flumazenil (Fig. 15 B, C y D). Estos resultados sugieren que el efecto ansiolítico inducido por la administración de β -sitosterol está relacionado con la participación del receptor GABA_A/BDZ.



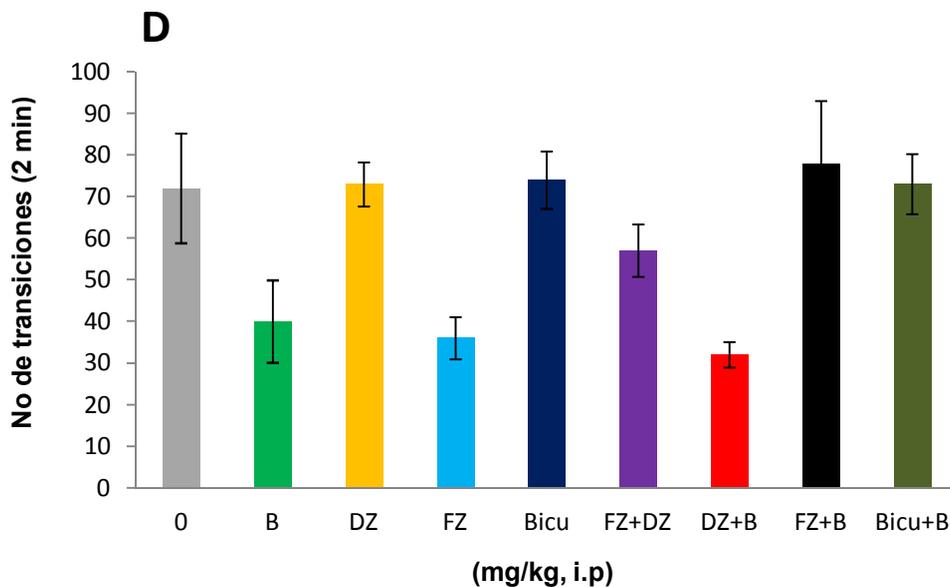
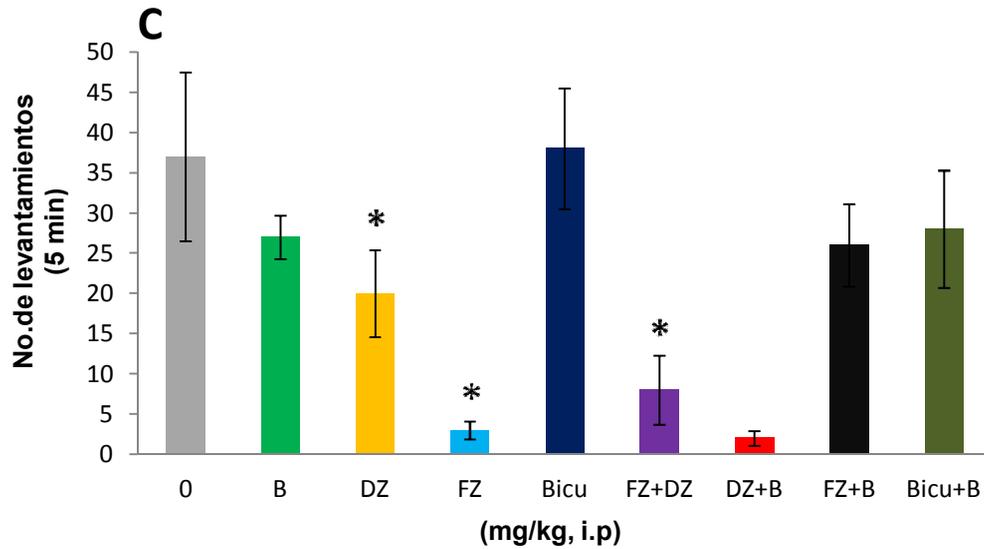


Figura 15. Evaluación de la participación del receptor $GABA_A$ / BZD en el efecto ansiolítico de β -sitosterol. Modelo de cruz elevada (A), tablero con orificios (B), cilindro (C) campo abierto (D). B = β -sitosterol 10 mg/kg; DZP = diazepam, 0.1 mg/kg; FMZ = flumazenil, 2.5 mg/kg, Bicu = bicuculina 0.2 mg/kg Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de seis animales. ANADEVa seguida de la prueba Dunnett.

7. DISCUSIÓN

Es importante la ampliación de las investigaciones científicas para conocer el posible mecanismo de acción de los productos naturales derivados de plantas de uso medicinal con el fin de obtener un medio alternativo para tratar los trastornos de ansiedad.

A la fecha poco se sabe de los efectos de β -sitosterol sobre el SNC. En el presente trabajo, los resultados obtenidos indican que la administración de β -sitosterol, un triterpeno aislado de *Tilia americana* var. *mexicana* produce un efecto ansiolítico que es mediado por el receptor GABA_A/BDZ. Este es el primer trabajo donde se describe por primera vez el posible mecanismo de acción del β -sitosterol.

Recientemente, se ha demostrado la actividad ansiolítica de los triterpenos α - y β -amirina presentes en *Glaphiria glauca* y *Centella asiática*, en estos estudios se comprobó una actividad ansiolítica a dosis bajas y sedativas a dosis altas en el modelo de cruz elevada, adicionalmente se mostró que el efecto ansiolítico de estos triterpenos puede estar asociado a mecanismos GABAérgicos (Brinkaus et., al, 2000, Herrera-Ruiz et., al, 2005).

En el modelo de exploración en brazos abiertos se observa que el β -sitosterol y el diazepam administrados individualmente presentan efecto ansiolítico al aumentar el tiempo de exploración en brazos abiertos, lo que nos indica que administrados de manera individual presentan actividad ansiolítica.

El diazepam es una benzodiazepina utilizada para el tratamiento de la ansiedad y frecuentemente usada como control positivo en modelos experimentales para conocer los efectos ansiolíticos de otros fármacos y poder esclarecer el mecanismo de acción (Herrera-Ruiz et., al, 2006).

El flumazenil y la bicuculina administrados individualmente no presenta ninguna actividad ansiolítica, en cuanto es administrado el flumazenil en asociación con el β -sitosterol en la dosis de 10mg/kg y el flumazenil en asociación con el diazepam este consigue revertir el efectos del diazepam y el β -sitosterol al disminuir en el tiempo de exploración en brazos abiertos, sugiriendo que ambos fármacos actúan a través de un mecanismo similar que involucra al receptor GABA_A/BDZ.

El pretratamiento con flumazenil y bicuculina bloquea el efecto ansiolítico de β -sitosterol, lo que sugiere la participación del receptor GABA_A /BDZ en su efecto ansiolítico, el flumazenil presenta alta afinidad por el receptor benzodiazepínicos

actuando como antagonista de este receptor y también actúa bloqueando los efectos de otros fármacos sedantes hipnóticos del SNC como los opiodes y anestésicos (Kleinggeist, et., al, 1998). La bicuculina es un alcaloide antagonista a receptores GABA_A por lo tanto nuestros resultados muestran claramente que el efecto ansiolítico del β -sitosterol involucra a dicho receptor (Aragao et., al, 2006).

Los efectos sedativos y ansiolíticos del β -sitosterol fueron corroborados por la potenciación en la duración de la hipnosis, el pentobarbital sódico disminuye la transmisión del acetilcolina y aumenta la transmisión de neurotransmisores inhibidores este barbitúrico actúa como depresor del SNC, su acción está relacionada con la capacidad de aumentar o disminuir la acción inhibidora del GABA, como sedante hipnótico el pentobarbital sódico deprime la corteza sensorial, disminuye la actividad motora, altera la función cerebral y produce somnolencia, sedación e hipnosis (Petty,1995). Trabajos realizados por Subarnas y cols. (1993) mostraron que β -amirina en dosis de 5-20 mg/kg potencian la hipnosis inducida por pentobarbital sódico en ratones, otro triterpeno aislado de *Scoparia dulcis* también prolongo el tiempo de sueño de los animales tratados con pentobarbital sódico (Oliveira et., al 2004).

8. CONCLUSIONES

1. En el modelo de campo abierto el β -sitosterol administrado i.p., en las dosis de 5 -20 mg/kg presenta actividad ansiolítica y en la dosis de 30 mg/kg presenta actividad sedativa.
2. El receptor GABA_A/BDZ participa como mecanismo de acción en el efecto ansiolítico de β -sitosterol.
3. En el modelo de campo abierto la administración de β -sitosterol en combinación con diazepam, induce una reducción en el efecto ansiolítico en comparación con los efectos individuales de ambos fármacos.
4. El pentobarbital en combinación con el β -sitosterol potenció el tiempo de sueño de los ratones, demostrando un efecto depresor del SNC.

9. REFERENCIAS

Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáquez y López, M.E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. 218 pp.

Agranoff, B., Wayne, R., Fisher, S. y Huller, M. 1999. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, E.U. 1183 pp.

Aguirre-Hernández, E., Rosas-Acevedo, H., Martínez, A. L., Soto-Hernández, M., Moreno, J., González-Trujano, M.E. 2007. Bioactivity-guided isolation of β -sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. *mexicana*. *Planta Médica* 73:1148-1155.

Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, Ma.E. Martínez, A.L., Moreno, J., Geoffrey. Terrazas, T., Soto-Hernandez, M. 2010 HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and Kaempferol. Flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology* 127:91-97

Bremer .B, Bremer. K, Chase.M, Fay.M, Reveal.J, Douglas, Solti. P, Soltis y Stevens. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: The angiosperm Phylogeny Group III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122630309/abstract>.

Aragao, G.F., Carneiro, L.M.U., Junior, A.P.F., Vieira, L.C., Bandeira, P.N., Lemos, T.L.G., Viana, G.S. 2006. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha and beta amyrim from *Protium hepatophyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 85:827-834.

Ashton, H. Benzodiazepine. 2002. Abuse, Drugs and Dependence, Harwood Academic Publishers. Rutledge London & New York.197-212,

Awad, A.B., Williams y Fink., C.S. 2003. Effect of Phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 14:111-119.

Azcoaga, J.E. 1981. Avances en Neurología. Editorial Científica Interamericana. 235 pp.

Balandrin, M.F., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R. 1993. Plant-derived natural products in drug development. *Journal American Chemical Society* 101: 3-12.

- Barr, M. y Klernam, J. 1994. El sistema nervioso humano. Un punto de vista anatómico. Harla S.A. México, D.F. 390 pp.
- Bouton, M.E., Mineka, S., Barlow, D.H. 2001. A modern's learning theory on the etiology of panic disorder. *Psychological Review* 108 1: 4-32.
- Bradford, H. 1988. Fundamentos de neuroquímica. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España. 485 pp.
- Brailowsky, S. 1998. La sustancia de los sueños. Neuropsicofarmacología. Segunda edición. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 355 pp.
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D y Hahn, E.G. 2000. Chemical, Pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica* .*Phytomedicine*. 7(5):427-449
- Bush, B.F.1929. The Mexican species of *Tilia*. *The American Midland Naturalist* 11:543-560.
- Bustamante, E. 2004. El sistema nervioso de las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial universidad de Antioquía 305 pp.
- Carrión, O., Bustamante, G. 2001. Ataques de pánico y trastornos de Fobia y Ansiedad. Editorial Galerna S.R.L. Buenos Aires. 218 pp.
- Clark, G., Koster, A.G. y Person, D.W. 1997. Exploratory behavior in chronic disulfotan poisoning in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 20:169-105.
- Constantino, C.P., León., Nevárez, A., Valencia, Y García, F. 2010. Costo-efectividad de ansiolíticos en los trastornos de ansiedad. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*.48 (3):303-308
- Cronquis, A. 1998. The evolution and classification of flowering plants. Second Edition. The New York Botanical Garden, New York. 555 pp.
- Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Negrete, P., Vidal, X. Silva, J.L., López-Pérez, A., San Feliciano y Muñoz, O. 2005. Analgesic-anti-inflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 99:119-124.
- Deutsch, S., Deutsch, A. 1993. Understanding the Nervous System, IEEE Press, New York, 394 pp.
- Dodman, N., Shuster, L. 1999. Psicofarmacología. Ed. Intermedica, México D.F, 109-124.

Estrada, L.1985. Maximino Martínez (1888-1964). Jardín botánico de plantas medicinales "Maximino Martínez". Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México, D.F. 41 pp.

González- Trujano, M.E., Navarrete, A., Reyes, B., y Hong, E.1998. Some pharmacological Effect of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research* 12:600-602

Hall, R.V., Rocha, P.M., Rodriguez, V.E. 2001. Plantas medicinales. Farmacéutica CIMED Universidad de Costa Rica.

Hardin, J.W.1990. Variation patterns and recognition of varieties of *Tilia americana*. *Systematic Botany* 15: 33-42.

Heinze, G., Ontiveros, M. 1998. La fitofarmacología como tratamiento alternativo en psiquiatría. *Salud Mental* 21:33-42.

Herrera-Ruíz, M., García, Y., Mora, S., Díaz, G., Viviana, G.S.B., Tortoriello, J y Ramírez, G. 2006. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal of Ethnopharmacology* 107 (1): 53-58.

Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, J.E., De Lima, T.C.M., Avilés-Montes. D., Pérez-García, D., González-Cortázar, M., Tortoriello, J. 2005. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine* 13: 23-28.

Herrera-Ruíz, M.L. 2008. Evaluación de la actividad ansiolítica de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltd.) Hardin y *Ocimum basilicum* Linn. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Hiller, K. y Zetler, G. 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis*: behavioral and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* 10:145- 151

Hurlé, M.A. 1997. Farmacología Humana. Masson. Barcelona España.295 pp.

Jones, G.N. 1968. Taxonomy of American species of Linden (*Tilia*). Illinois Biological Monographs 39: 1-156.

Khawaled, R., Bruening-Wright, A., Adelman, J. P., Maylie, J. 1999. "Bicuculline Block of Small-conductance Calcium-activated Potassium Channels". *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 438 (3): 314–321.

Kleinggeis, B., Bocker, R., Geissliner, G., Brugger, R. 1998. Isolation and Pharmacological Characterization of Microsomal Human Liver Flumazenil Carboxyl esterase, *Pharmaceut Science*, 1:38-46

Leiguarda, R.C. 1992. Neurología. Biblioteca de Medicina. Editorial el Ateneo. 771 pp

Linares, E., B. Flores y R. Bye. (1995). Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales. Segunda edición. Ed. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI) y el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM). México, D.F. 155 pp.

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

Martínez, M. 1969. Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México D.F. 329-330 pp.

Martínez, M.A. 2005. Evaluación del perfil neurofarmacológico del extracto etanólico de las hojas de *Magnolia dealbata* en ratones. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México, D.F. 115 pp.

Medina-Mora, Ma.E., Borges, C., Lara-Muñoz, C., Benjet, J., Blanco-Jaimes, C., Fleiz-Bautista, J., Villatoro-Velázquez, E., Rojas-Guiot, J., Zambrano-Ruíz, L., Casanova-Rodas y Aguilar-Gaxiola, S. 2003. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental* 26 (4):1-16

Monroy-Ortiz, C., Castillo- España, P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 251, 253, 319 pp.

Nathan, P., Gorman. Y Salkind, N. 2002. Tratamiento de los trastornos mentales. Una guía de tratamientos que funcionan. *Madrid*: Editorial Alianza. 254 pp.

Nieto, M. 1991. Función cerebral. Libros de Investigación y Ciencia. Prensa Científica, S.A. Barcelona España. 192 pp.

Oswiecimska, M., Bednarska, D. Sgarkowska, J. 1976. Protoanthocyanidins (Leukoanthochanidins) in inflorescentia *Tilia* e. *Herbal Pol* 22: 17-22

Pavón, N. 2000. An endangered and potentially economic tree of México: *Tilia mexicana* (Tiliáceae). *Economic Botany* 54 (1): 113-114

Pavón, N.P. y V. Rico-Gray. 2000. Notes on economic plants. *Economic Botany* 54:113-118.

Pelletier, X. S., Belbraouet, D., Mirabel, F., Mordret., J.L., Perrin, X. y Debry.G. 1995. A diet moderately enriched in Phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutrition Metabolic* 39:291-295.

Pérez de la Mora, M.2003. Donde y como se produce la ansiedad: sus bases biológicas. *Ciencias* 54: 16-28.

Pérez-Ortega, G., Guevara-Fefer, P., Chávez, M., Herrera, J., Martínez, A., Martínez, AL., González-Trujano, M.E.2008. Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of States of Michoacán, México. *Ethnopharmacology* 116: 461-468.

Petty, F.1995. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *Journal of Affective Disorders* 34:275-281

Rang, H.P y Dale, M.M. 1992. *Farmacología*. Churchill Livingstone, Madrid, España. 1023 pp.

Rodríguez-Landa, J.F. y Contreras, C.M. 1998. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Revista Biomédica* 9:181-191

Schwartz, J.H., Jesse, T.M .2000. *Principles of neural science*. Appleton& Lange, Norwak. 387 pp

Snell, R.1991. *Neuroanatomía Clínica*, Editorial Medica Panamericana.575 pp.

Tang Ya y Zhuage Ren. 1996. Geographical distribution of *Tilia* L. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 34: 254-264

Villaseñor, I.M., Angelada., Comlas, A.P. y Echegoyen, D. 2002. Bioactivity studies of beta sitosterol and its glycoside. *Phytotherapy Research* 16:417-421.

Volák., Stodola, J. 1990. *Plantas Medicinales*. Susqueta. Praga, Checoslovaquia. 319 pp.

Wichtl, M. 2004. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis*. Medipharm Scientific Publishers. Stuttgart CRC Press. Germany 611-613

Wong, A.H., Smith, M., Boon, H.S. 1998. Herbal remedies in psychiatric practice. *Archgen Psychiatri* 55: 1033-1041.