



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
CAMPUS II

"Caracterización del efecto terapéutico del
extracto acuoso de *Calea zacatechichi* Schdl"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ADRIÁN CRUZ TAVERA

Directora de tesis:

Dra. Lucía Alba Martínez Mota

Asesora:

Mtra. Dora Alicia Pérez González

Ciudad de México, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi más grande amor en la vida, mi mamá, que con su cariño y comprensión supo guiarme en la vida y me enseñó a alcanzar mis metas.
Gracias.

A mi familia que me apoyo de tantas maneras: Omar, Rafa y Martha, siempre los traigo en el corazón.

A Amabile que me dio ese respiro que necesitaba cuando sentí que me ahogaba, te amo.

A la maestra Dora por ser una gran maestra y amiga desde hace tanto tiempo

A la Dra. Lucia que me dio la oportunidad de aprender y de darme cuenta de la gran persona que es.

A la Dra. Rosa Estrada por que siempre supo animarme a seguir adelante con el proyecto y por su indispensable apoyo con la preparación del extracto y su análisis.

Al Dr. Ignacio y a Lilian por enseñarme los detalles de su investigación en sueño y su apoyo con material para continuar con el estudio de la planta.

A la UNAM y sus maestros que me inspiraron a perseguir este triunfo.

DEDICATORIA

A mi abuelita Lupita Q.E.P.D. †

ÍNDICE

1	Introducción	2
1.1	Plantas medicinales en México	2
1.2	Los síndromes culturales	3
2	Marco teórico	4
	<i>Calea zacatechichi</i> Schdl	
2.1	Descripción botánica	4
2.2	Descripción geográfica	5
2.3	Cultivo	6
2.4	Sinonimia	6
2.5	Uso etnofarmacológico	6
2.6	Uso chamánico	6
2.7	Estudios previos	7
2.8	Estudios previos de sus efectos en el SNC	8
2.9	Fitoquímica de <i>Calea zacatechichi</i>	12
3	Los trastornos mentales	15
3.1	Trastornos de la ansiedad	16
3.1.1	Etiología de los trastornos de la ansiedad	16
3.1.2	Fisiopatología de la ansiedad	17

3.1.3	Tratamientos farmacológicos para la ansiedad	19
3.1.4	Remedios herbolarios para la ansiedad	20
3.2	Trastornos depresivos	21
3.2.1	Etiología de los trastornos depresivos	22
3.2.2	Fisiopatología de la depresión	22
3.2.3	Tratamientos farmacológicos para la depresión	24
3.2.4	Remedios herbolarios para la depresión	25
3.2.5	Comorbilidad con ansiedad	25
3.2.6	Trayectoria de atención seguida por pacientes con ansiedad y depresión en México	26
4	Pruebas en animales para el estudio de trastornos mentales	28
4.1	Validación de pruebas conductuales para uso en la investigación	28
4.2	Pruebas en animales para el estudio de la ansiedad y la depresión	29
4.3	Pruebas en animales para el estudio de la actividad locomotriz	30
4.4	Efecto de fármacos ansiolíticos y antidepresivos en las pruebas de LC, ED, y nado forzado	32

5	Planteamiento del problema	36
5.1	Hipótesis	36
5.2	Objetivo general	37
5.3	Objetivos particulares	37
6	Material y métodos	38
6.1	Diseño experimental	38
6.2	Población de estudio	38
6.3	Criterios de inclusión	39
6.4	Criterios de exclusión	39
6.5	Criterios de eliminación	39
	Técnicas	39
6.6	Obtención del material vegetal y preparación del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i>	39
6.7	Experimentos	40
6.7.1	Experimento 1. Estudio piloto mediante tamizaje farmacológico	40
6.7.2	Experimento 2. Caracterización del efecto terapéutico del extracto en modelos animales de ansiedad o depresión	41
6.7.3	Baterías de pruebas conductuales	42

6.7.4	Prueba de laberinto elevado en cruz	43
6.7.5	Prueba de enterramiento defensivo	44
6.7.6	Prueba de nado forzado	46
6.7.7	Prueba de actividad locomotora en campo abierto	47
6.7.8	Prueba de rota-rod	48
6.8	Análisis estadístico	50
7	Resultados	51
7.1	Efecto del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en un screening farmacológico	51
7.2	Efecto del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en la ansiedad y la depresión experimentales	51
7.2.1	Laberinto elevado en cruz	51
7.2.2	Enterramiento defensivo	55
7.2.3	Nado forzado	57
7.3	Efecto del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en la actividad motriz	58
7.3.1	Campo abierto	59
7.3.2	Coordinación motriz	60
8	Discusión	61
8.1	El extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> produce efecto	62

	ansiolítico en modelos animales	
8.1.1	Diferencias entre modelos	64
8.2	El extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> produce efecto de tipo antidepresivo en la PNF	66
8.3	Posibles efectos tóxicos de <i>Calea zacatechichi</i>	67
8.4	Posibles componentes responsables de los efectos hallados	69
8.4.1	Efectos de <i>Calea zacatechichi</i> en la ansiedad y la depresión	71
8.5	Perspectivas y limitaciones del estudio	71
	Conclusiones	74
	REFERENCIAS	75
	Anexo 1. Composición fitoquímica de <i>Calea zacatechichi</i>	97
	Anexo 2. Historia del Zacatechichi	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
1	Foto de la planta <i>Calea zacatechichi</i>	4
2	Distribución de <i>Calea zacatechichi</i>	5
3	Representación gráfica de los estudios de Díaz 1979	9
4	Representación gráfica de los estudios de Mayagoitia 1986	10
5	Estructuras de algunos sesquiterpenoides lactónicos aislados de <i>Calea zacatechichi</i>	13
6	Estructuras de algunos flavonoides aislados de <i>Calea zacatechichi</i>	14
7	Mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos	23
8	Hipótesis de redes neuronales de la depresión	23
9	Diagrama de la trayectoria de atención seguida por pacientes con ansiedad y depresión en México	27
10	Tamizaje farmacológico para detección de la dosis adecuada para el estudio	41
11	Diagrama del tratamiento subcrónico adaptado del método de Martínez-Mota 2008	42
12	Esquema de baterías de pruebas para ansiedad y	42

	depresión	
13	Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en LEC	53
14	Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en LEC	54
15	Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en ED	56
16	Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en PNF	58
17	Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de <i>Calea zacatechichi</i> en CA	60
18	Fragmento del código De la Cruz Badiano	99
19	Ilustración de Francisco Hernández de <i>Chamedri mexicana</i>	100
20	Fragmento de la descripción botánica de <i>Calea zacatechichi</i> realizada por Schlechtendal publicada en la revista <i>Linnaea</i>	101
21	<i>Calea zacatechichi</i> , ilustración de Adolfo Tenorio, 1894	103
22	Foto del botánico Thomas Baillie MacDougall	104

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Descripción	Página
1	Efecto de <i>Calea zacatechichi</i> en voluntarios sanos: Reportes de experiencias	9
2	Efecto de <i>Calea zacatechichi</i> (extractos metanólico y hexánico) en gatos	10
3	Efecto de <i>Calea zacatechichi</i> (extractos metanólico y hexánico) en voluntarios sanos	11
4	Principales terapias farmacológicas de los trastornos de la ansiedad	20
5	Dimensiones conductuales traslapadas en ansiedad y depresión	26
6	Validación de pruebas conductuales en animales para la investigación de los trastornos mentales	29
7	Fundamento de las pruebas conductuales realizadas	31
8	Efecto de los fármacos en la prueba de LEC	33
9	Efecto de los fármacos en la prueba de ED	34
10	Efecto de los fármacos en la PNF	35
11	Interpretación de las conductas medidas en la prueba de LEC	44
12	Interpretación de las conductas medidas en la prueba de	45

	ED	
13	Interpretación de las conductas medidas en la PNF	47
14	Interpretación de las conductas medidas en la prueba de CA	47
15	Material de laboratorio, biológico, instrumentos y reactivos empleados por prueba	49
16	Resultados estadísticos de la prueba de LEC	52
17	Resultados estadísticos de la prueba de ED	55
18	Resultados estadísticos de la PNF	57
19	Resultados estadísticos de la prueba de CA	59
20	Resultados obtenidos en la prueba de coordinación locomotriz	61
21	Resumen de resultados	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptofano o Serotonina
AE	Acercamientos al electrodo
AL	Actividad locomotriz
ANOVA	Analysis of variance
ATC	Antidepresivos tricíclicos
CHO	Choques
CRS	Cruces
DA	Dopamina
EBA	Entradas a brazo abierto
EBC	Entradas a brazo cerrado
E.E.M.	Error estándar de la media
ED	Enterramiento defensivo
ENT	Tiempo total de enterramiento
ESC	Escalamiento
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HET-CAM	Acrónimo para “Hen's Egg Test -chorioallantoic membrane” o prueba de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo para irritabilidad y/o actividad antiinflamatoria.
IC	Inmersiones de cabeza

IMAO	Inhibidor de la monoaminoxidasa
IMEPLAN	Instituto mexicano para el estudio de las plantas medicinales
INM	Inmovilidad
INPRFM	Instituto nacional de psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
IRNS	Inhibidores de la recaptura de noradrenalina
ISRS	Inhibidores de la recaptura de serotonina
KW	Prueba de Kruskal-Wallis
LAT	Latencia de enterramiento
LEC	Laberinto elevado en cruz
N/A	No aplica
NA	Noradrenalina
NAD	Nado
OMS	Organización mundial de la salud
PNF	Prueba de nado forzado
r.p.m.	Revoluciones por minuto
REM	Rapid eye movements
S.S.I.	Solución salina isotónica
SNC	Sistema nervioso central
SW	Prueba de Shapiro-Wilk

TBA	Tiempo en brazo abierto
TBC	Tiempo en brazo cerrado
TC	Tiempo en centro
UNAM	Universidad nacional autónoma de México

Resumen

Las plantas medicinales han sido empleadas durante muchos años para aliviar síntomas asociados a la ansiedad y la depresión, en los denominados “síndromes culturales”, como “nervios” o “tristeza”. *Calea zacatechichi* es un arbusto endémico de México que es empleado por chamanes chontales de Oaxaca en la oniromancia. Los reportes científicos de la planta sugieren que podría tener propiedades como ansiolítico y/o antidepresivo, aunque no se han realizado estudios sistemáticos para comprobarlos. El objetivo fue determinar si *Calea zacatechichi* produce efectos ansiolíticos y/o antidepresivos en modelos animales. Ratas macho Wistar fueron tratadas con el extracto acuoso (3.125-50 mg/kg, v.o.) y evaluadas en: a) pruebas de laberinto elevado en cruz (LEC) y enterramiento defensivo (ED), para detectar efectos ansiolíticos, b) prueba de nado forzado (PNF), para detectar efecto antidepresivo, y c) pruebas de campo abierto y rotarod, para identificar alteraciones de la actividad y coordinación locomotriz. El extracto (25-50 mg/kg v.o.) incrementó el tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto, así como el número de inmersiones de cabeza. En la prueba de ED, no provocó efectos ansiolíticos, cambios en la nocicepción o en el tiempo de reacción al estímulo adverso. En la PNF el extracto (25-50 mg/kg, v.o.) disminuyó la inmovilidad y aumentó el escalamiento. Estos efectos no fueron atribuidos a alteraciones de la actividad general o la coordinación locomotriz. Los resultados revelan que *Calea zacatechichi* produce efectos de tipo ansiolítico y antidepresivo, que respaldan su potencial para ser usado en el tratamiento de la ansiedad y la depresión.

Introducción

1.1 Plantas medicinales en México

Más del 90% de los mexicanos emplean plantas medicinales para el tratamiento empírico de muchas enfermedades ⁽¹⁾. Los motivos por los que la gente las usa en forma de remedios herbolarios es por tradición, eficacia y bajo costo ⁽²⁾. Estas plantas además tienen las ventajas de que, a menudo, son de baja toxicidad, y se tiene un conocimiento empírico amplio de sus efectos, por lo que es posible incluso calcular las dosis efectivas con base en tales datos empíricos/anecdóticos ⁽³⁾.

La utilización popular de las plantas se divide en 2 líneas principales: Chamanismo y Herbolaria. El chamanismo trata con enfermedades de origen espiritual cuyos síntomas son un inexplicable dolor interno y son, en general, padecimientos severos ⁽⁴⁾, los que incluyen síndromes culturales ⁽⁵⁾. Mientras que la herbolaria ayuda a tratar enfermedades cuya etiología es de causas "naturales" tales como heridas ó infecciones ⁽⁴⁾.

Los pueblos indígenas en el chamanismo usan especies vegetales que contienen compuestos con actividad a nivel del sistema nervioso central (SNC). La importancia de estudiarlas, es que el conocimiento científico podría conducir al descubrimiento de nuevas moléculas para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas como las adicciones, el trastorno obsesivo compulsivo, la ansiedad o la depresión ^(6, 7, 8, 9, 10, 11).

1.2 Los síndromes culturales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado que para el 2020 la depresión será la principal causa de incapacidad laboral en México ⁽¹²⁾. Por otro lado, los trastornos de ansiedad son actualmente el principal motivo por el cual la población mexicana solicita atención psiquiátrica ⁽¹³⁾. La principal herramienta con la que cuentan actualmente los médicos psiquiatras para atender estos malestares son fármacos que, si bien producen los efectos esperados, la tasa de remisión es del 70 % en el caso de la depresión, o producen efectos adversos que provocan el abandono del tratamiento (p.ej. algunos antidepresivos), o incluso inducen signos de adicción (p.ej. las benzodiazepinas). Es por ello que surge la necesidad de encontrar nuevos tratamientos que puedan emplearse para mejorar la terapéutica. Los síndromes culturales son enfermedades psicosomáticas que afectan a una cultura específica, muchas veces estas enfermedades son en realidad desórdenes mentales como la depresión (tristeza, tiricia) o la ansiedad (mal de espanto, susto, nervios) ⁽⁵⁾.

El presente estudio tiene como fin explorar en el laboratorio los efectos de *Calea zacatechichi*, una planta que se utiliza en rituales de adivinación a través de los sueños (oniromancia) por los indígenas chontales de Oaxaca, de la cual se han realizado pocos estudios científicos acerca de sus efectos farmacológicos ⁽³⁾. Entre los reportes se indica que *Calea zacatechichi* provoca un aumento en el número de sueños, y una sensación de tranquilidad que dura varios días ⁽¹⁴⁾. Sobre este último aspecto, no existen a la fecha estudios científicos que confirmen las propiedades antidepresivas o ansiolíticas de esta especie.

Marco teórico

Calea zacatechichi Schdl.

2.1 Descripción botánica.

La *Calea zacatechichi* (figura 1) es un arbusto que pertenece a la familia de las “asteráceas”, misma a la que pertenecen la lechuga (*L. sativa*) y la manzanilla (*M. recutita*)⁽¹⁵⁾; mide de 1-1.5 m de altura, tiene muchas ramas de tipo oviforme y hojas opuestas de 3-5 cm de largo y 2-4 cm de ancho. Las hojas muestran bordes aserrados, terminaciones puntiagudas y un peciolo corto, son rugosas y pubescentes. La inflorescencia es pequeña y densa, con los pedicelos más cortos que las cabezas⁽¹⁶⁾. Esta especie no se encuentra registrada en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza por lo que no es considerada una especie en peligro de extinción⁽¹⁷⁾.



Figura 1. Foto de la planta *Calea zacatechichi*⁽¹⁸⁾ Fuente: Weber, 2009.

A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de *Calea zacatechichi*.

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Subfamilia: *Asteroideae*

Tribu: *Neurolaeneae*

Género: *Calea*

Especie: *Calea zacatechichi* Schdl ⁽¹⁹⁾

2.2 Descripción geográfica

Calea zacatechichi crece desde México hasta Costa Rica ⁽⁶⁾; en la República Mexicana la planta vegeta principalmente en los estados de Morelos, Veracruz y Oaxaca ⁽³⁾. En la figura 2, se indica en verde la distribución de la planta, adaptada del sitio de *The global biodiversity information facility* ⁽²⁰⁾ en la cual se observa su presencia también en Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras y Nicaragua.



Figura 2. Distribución de *Calea zacatechichi* ^(20, 21). Adaptado de EOL y GBIF 2013.

2.3 Cultivo

Calea zacatechichi es plantada en lugares soleados con riego moderado, tolera casi cualquier tipo de suelo, pero prefiere sustratos bien drenados, crece bien en sombra o en sol; no se recomienda el sobre riego ⁽²²⁾.

2.4 Sinonimia

La palabra "Zacatechichi" es de origen náhuatl y significa "pasto amargo" ⁽²³⁾.

A esta especie también se le conoce como: *xikin*, *ahuapahtli*, *chichixihuitl*, "zacate amargo", *thle-pela-kano*, "zacate de perro", "hoja madre", "hoja de dios" ^(3, 23) y "betónica" ⁽²⁴⁾.

2.5 Uso etnofarmacológico

La planta entera (hojas, tallo y raíz) es empleada en la medicina popular como aperitivo, remedio para los desórdenes gastrointestinales, para la tos y el asma ⁽²⁵⁾, colagogo, catártica, antidisentérico y febrífugo ⁽²⁴⁾. Además, es empleada como laxante, astringente, antidiarréico, "para el hígado", y para producir aversión al tabaco ⁽²³⁾.

2.6 Uso chamánico

En la región de Oaxaca, México, esta planta forma parte de la medicina tradicional chamánica de los indígenas Chontales desde la época precolombina ⁽²⁶⁾.

Los Chontales bebían una infusión de las hojas secas de *Calea zacatechichi*, luego fumaban cigarrillos de la misma planta, tras lo cual tenían visiones en sus sueños; esto con el propósito de recibir mensajes de tipo adivinatorios,

manifestados en forma de ensoñaciones ^(23, 27, 28), en donde dicen recibir mensajes donde ven el futuro, la ubicación de objetos perdidos o el diagnóstico de enfermedades ⁽¹⁴⁾. Por tales efectos algunos investigadores han propuesto que la planta contiene alcaloides psicoactivos como metabolitos secundarios. Sin embargo, los estudios fitoquímicos conducidos a la fecha han revelado que no los contiene ⁽²⁹⁾.

Para las culturas mesoamericanas los sueños ocurren en un plano de la realidad suprasensorial, por lo que los creen capaces de llevar mensajes. El empleo de plantas para producir o aumentar los sueños de naturaleza adivinatoria constituye una categoría etnofarmacológica llamada "oniromancia" ⁽³⁰⁾.

La *Calea zacatechichi* es muy importante a nivel cultural y tiene una función valiosa para los Chontales y otros grupos indígenas, ya que ellos deciden actuar o no con base en la interpretación de los sueños que obtienen al consumirla ⁽²³⁾. Actualmente existen usuarios modernos de *Zacatechichi*, los cuales reportan también haber experimentado sueños premonitorios ⁽³¹⁾.

2.7 Estudios previos

Según estudios de *Datos para la materia médica mexicana* "no resultó ser tóxica para el humano, produce efectos purgantes y algunas veces provoca vómitos, no modifica favorablemente los fenómenos químicos de la digestión, disminuye la fiebre, pero no cura el paludismo" ⁽³²⁾, aunque años más tarde demostró poseer actividad antileishmánica ⁽³³⁾ y antiplasmódica ⁽³⁴⁾.

Además, diversos estudios hechos a la planta *Calea zacatechichi*, demostraron su

actividad antiinflamatoria ^(35, 36) y se ha demostrado también su efecto hipoglicémico ⁽³⁷⁾.

2.8 Estudios previos de sus efectos en el SNC

Se han hecho pocos estudios de los efectos de la planta en el SNC; solamente existen los reportes de dos investigadores: José Luis Díaz ^(14, 23) publicó los estudios preliminares de autoexperiencias en humanos, y luego Lilian Mayagoitia ⁽³⁰⁾ analizó sus efectos en la conducta y actividad cerebral de gatos, así como en individuos sanos durante la vigilia y el sueño.

De acuerdo con Díaz ⁽¹⁴⁾ la planta bebida en infusión e inhalada durante la vigilia, produce una “sensación de bienestar” y un gran “relajamiento” que conduce a una somnolencia y finalmente al sueño. El consumo ancestral podría guardar relación con estas propiedades tranquilizantes ⁽³⁸⁾. En la figura 3, se representa el estudio de Díaz ⁽²³⁾ en donde reporta los efectos de la especie en dos grupos de voluntarios que fueron expuestos a dos formas de consumo de *Calea zacatechichi*: bebida como infusión y fumada, durante el día o la noche.

En el primer grupo, que ingirió una infusión e inhaló la planta antes de dormir, *Calea zacatechichi* provocó sueños vívidos por la noche. El otro grupo de individuos que consumió poca infusión durante la vigilia, y fumó varios cigarros de la planta, refirió experimentar una sensación de bienestar y dificultad para recordar cosas, entre otros efectos, en la tabla 1, se resumen los resultados de este estudio ⁽²³⁾.

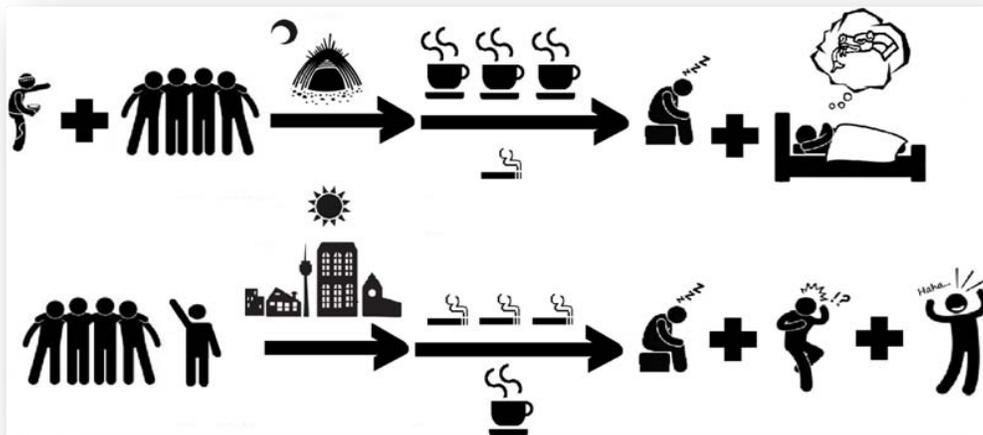


Figura 3. Representación gráfica de los estudios de Díaz 1979

Tabla 1. Efecto de <i>Calea zacatechichi</i> en voluntarios sanos: Reportes de experiencias				
Contexto	Horario	Número de voluntarios	Dosis y vía de administración	Efectos
Rural, bajo la supervisión de un indígena Chontal transculturado	Momentos antes de dormir	4	Infusión bebida e inhalación moderadas	-Somnolencia -Sueño nocturno particularmente tranquilo -Sueños vividos por la noche
Urbano sin supervisión del Chontal transculturado	Durante la vigilia.	5	Varias inhalaciones e ingesta moderada de infusión	-Sensación de bienestar -Somnolencia -Mareo -Dificultad para recordar -Intensificación de las imaginerías hipnagógicas

La tabla fue elaborada con los datos de Díaz 1979.

En la figura 4, se ejemplifica el estudio realizado por Mayagoitia y cols. ⁽³⁰⁾ quienes probaron la planta en extractos hexánico y metanólico. Los extractos se administraron a gatos en forma de cápsulas con el fin de analizar sus efectos sobre la conducta, y de comparar éstos con los de varios fármacos disociativos. El método de evaluación fue mediante electroencefalograma para analizar la actividad eléctrica del sistema límbico, y así obtener información de posibles efectos tóxicos. En el mismo estudio se administró el extracto a voluntarios sanos para analizar sus posibles efectos hipnóticos y los efectos subjetivos en el sueño durante la siesta y el sueño normal. Los resultados en ambos sujetos de investigación son descritos en las tablas 2 y 3.

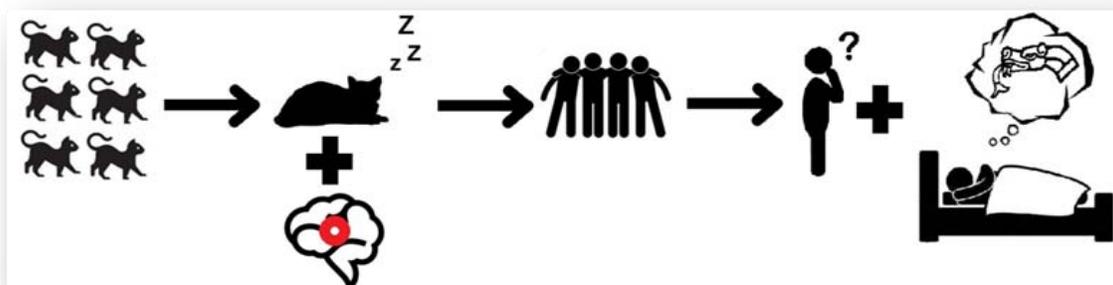


Figura 4. Representación gráfica de los estudios de Mayagoitia 1986.

Tabla 2. Efecto de <i>Calea zacatechichi</i> (extractos metanólico y hexánico) en gatos		
Prueba y objetivo	Resultados	Conclusiones
Conducta	- A partir de la dosis equivalente de 1g/kg de material seco provocó somnolencia y sueño.	-Posibles propiedades hipnóticas
Objetivo: Detectar posibles efectos tóxicos	-A partir de la dosis equivalente de 4g/kg de material seco produjo ataxia y cabeceos	-Efectos conductuales similares a los observados con fármacos disociativos como el tolueno y dopaminérgicos
Electroencefalograma	-Durante la somnolencia se registraron trazos característicos de sueño de ondas lentas, y en general no hubo similitud con los trazos registrados con las sustancias disociativas probadas.	-El extracto no posee efectos tipo alucinógenos ó disociativos, son aparentemente efectos del tipo "inductores del sueño" solamente
Objetivo: Comparar su efecto con compuestos disociativos.		-Se decide probarlo en humanos

La tabla fue elaborada con los datos de Mayagoitia 1986.

Tabla 3. Efecto de <i>Calea zacatechichi</i> (extractos metanólico y hexánico) en voluntarios sanos		
Prueba y objetivo	Resultados	Conclusiones
Tiempo de reacción y Estimación de lapso de tiempo	-El extracto metanólico demuestra poseer el mayor efecto en los tiempos de ambas pruebas	-El extracto no es alucinógeno -Posible efecto hipnótico
Objetivo: Medir los posibles efectos hipnóticos Siesta	-Los sujetos no reportan efectos alucinatorios. -Ligero aumento en la frecuencia respiratoria	-Los compuestos se hallan en mayor proporción en la fase polar. -Posible presencia de compuestos estimulantes ó analépticos
Objetivo: Ver los efectos en siesta del extracto metanólico Sueño	-Se observó un aumento en la vigilia quieta con el extracto metanólico -El extracto metanólico produjo una mayor cantidad de sueños que el placebo y sueños de mayor contenido colorido	-Mayor efectividad de los compuestos que se hallan en la fase polar -Posible de aumento de la frecuencia de episodios REM en sueño
Objetivo: Medir los efectos del extracto en el número y calidad de sueños		

La tabla fue elaborada con los datos de Mayagoitia 1986.

En conjunto, los resultados sugieren la presencia de uno ó varios compuestos presentes en *Calea zacatechichi* con las siguientes propiedades: a) Hipnóticas, por la dificultad para recordar eventos ⁽²³⁾, y por el aumento en el tiempo de reacción y estimación de lapso de tiempo ⁽³⁰⁾, b) Analépticas, por el aumento en la frecuencia respiratoria ⁽³⁰⁾, c) Potenciador de la fase "rapid eye movements" (REM), por el aumento en el numero de sueños coloridos ⁽³⁰⁾ y d) Tranquilizantes y/o mejoradoras del estado de ánimo por los reportes de "sensación de bienestar" y "relajamiento" ⁽²³⁾. De acuerdo con estos efectos, *Calea zacatechichi* está clasificado como un depresor débil del SNC ^(23, 30).

2.9 Fitoquímica de *Calea zacatechichi*

Calea zacatechichi contiene diversos compuestos entre los cuales se incluyen: Sesquiterpenos, flavonoides, alqueninos, monoterpenos, heterociclos oxigenados, triterpenos, esteroides y un poliprenoide ⁽³⁹⁾. No se ha aislado de esta planta ningún compuesto alucinógeno, ni alcaloides ^(3, 14, 29, 30).

Las sesquiterpenlactonas son compuestos amargos que se encuentran en las flores y en las partes aéreas de las plantas, su estructura química está formada por una cadena de 15 carbonos, la mayoría de estos compuestos poseen un anillo de lactona en el carbono 6. Algunos de los efectos de las sesquiterpenlactonas en el SNC incluyen efectos de: sedación ⁽⁴⁰⁾, ansiólisis y antidepresivos ⁽⁴¹⁾. Las sesquiterpenlactonas que contiene *Calea zacatechichi* son del tipo germacranólidas, cuya biosíntesis y estructura son similares a la de las hormonas esteroideas. De la planta se aisló un germacranólido llamado caleicina (figura 5); otras sustancias con la estructura básica de esta molécula han sido aisladas en variedades reportadas como “no activas”, refiriéndose a que carecen del efecto tipo onírico ^(14, 23).

En varias fuentes se menciona que *Calea zacatechichi* posee además calaxina y ciliarina; esto probablemente sea una confusión ya que en el estudio de Ortega ⁽⁴²⁾ en donde supuestamente se menciona que estas moléculas fueron aisladas de *Calea zacatechichi*, no se menciona en absoluto a la especie, y se reportan en cambio otras especies que fueron: *C. axillaris* en donde se halló a la calaxina, y *H. ciliaris* para la ciliarina ⁽⁴²⁾.

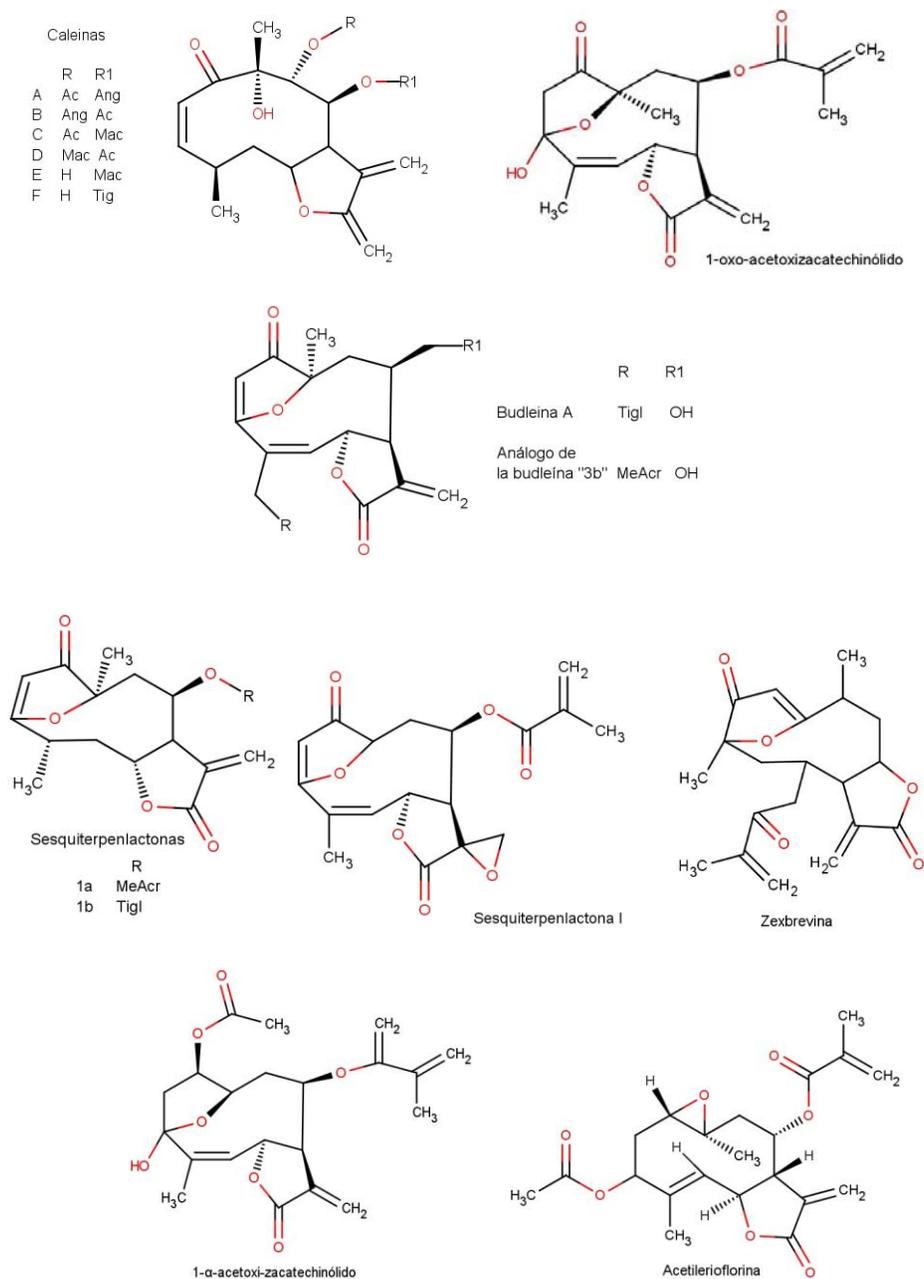


Figura 5. Estructuras de algunos sesquiterpenoides lactónicos aislados de *Calea zacatechichi*.

En la figura 6, se muestran las estructuras de algunos compuestos flavónicos aislados de *Calea zacatechichi*. Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas, cuya estructura general es un esqueleto de 15 carbonos, que consiste de 2 anillos fenólicos y uno heterocíclico ⁽⁴³⁾.

Poseen actividades antioxidantes que previenen el estrés oxidativo, el cual es un proceso que se cree es una de las causas de desórdenes que afectan al SNC ⁽⁴⁴⁾; también poseen actividades vasodilatadoras ⁽⁴⁵⁾, algunos son antidepresivos como el hiperósido aislado de *Hypericum perforatum* y otros, ansiolíticos como el tilirósido, aislado de *Tila americana* var. *mexicana* ^(46, 47). Los flavonoides al igual que las sesquiterpenlactonas son fármacos con pocos o nulos efectos tóxicos, lo que los hace muy atractivos para ser empleados en el tratamiento de los trastornos mentales o algunos de sus síntomas.

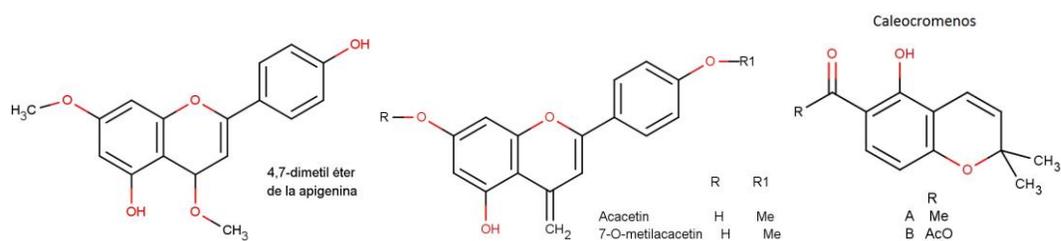


Figura 6. Estructuras de algunos flavonoides aislados de *Calea zacatechichi*.

Los trastornos mentales

Un trastorno mental se define como el síndrome, patrón conductual ó psicológico de significancia clínica, que aparece asociado a: a) un malestar (p. ej.: dolor), b) una discapacidad, c) un riesgo significativamente aumentado de morir, d) un riesgo significativamente aumentado de sufrir dolor, ó e) a la pérdida de la libertad ⁽⁵⁾.

De acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica, en México aproximadamente 1 de cada 4 adultos que viven en un ambiente urbanizado ya tiene una historia de trastornos mentales, siendo los trastornos de ansiedad los más frecuentes de la población, seguidos por los trastornos afectivos (depresión mayor es el más frecuente), y estos a su vez por los de abusos de sustancias ⁽⁴⁸⁾.

Para los fines de esta tesis proporcionaremos información acerca de la ansiedad y la depresión, dos de las entidades psiquiátricas más comunes en México. Ambos trastornos son discapacitantes, y la OMS calcula que para el año 2020 la depresión será la primera causa de incapacidad laboral ⁽¹²⁾. Por otro lado, la incidencia de la ansiedad es del 14.3% siendo éste el desorden mental más frecuente en la nación ⁽¹³⁾, además se sabe que padecer trastornos de la ansiedad podría incrementar el riesgo de otros problemas de salud mental, principalmente depresión, y de consumir drogas de abuso como alcohol, tabaco, marihuana ó sustancias ilegales ⁽⁴⁹⁾.

3.1 Trastornos de ansiedad

La ansiedad en el humano es una respuesta emocional normal de miedo o aprensión ante situaciones nuevas, de peligro, o ante una amenaza real, anticipada o imaginada, que posee un doble componente físico y psíquico, y que provoca una conducta de ataque ó huida ⁽⁵⁰⁾. Los síntomas físicos más comunes son la tensión motora, vigilancia, e hiperactividad autónoma ⁽⁵¹⁾. Cognitivamente una persona podría engancharse en pensamientos catastróficos, hipervigilancia, aprensión, reflexión y preocupación excesivas ⁽⁵²⁾. Además de una emoción normal, la ansiedad es la patología psiquiátrica más frecuente ⁽⁵³⁾.

Como entidad patológica se caracteriza por intranquilidad, desesperación, temor y preocupaciones excesivas ⁽⁵⁾; se considera que es un trastorno cuando ha persistido por al menos 6 meses ⁽⁵⁾. Existen varias categorías principales de los trastornos de ansiedad que incluyen: fobias específicas, fobias sociales, desórdenes de pánico, trastorno generalizado de la ansiedad, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de estrés post-traumático, trastorno de estrés agudo, etc. ⁽⁵⁴⁾.

3.1.1 Etiología de los trastornos de la ansiedad

La ansiedad es causada principalmente por estresores ambientales (p. ej. problemas socioeconómicos); sin embargo, su origen está relacionado evolutivamente a la emoción de miedo y a la respuesta de “lucha-huida” en mamíferos que ocurre después de percibir un evento adverso, como ataques ó amenazas. La respuesta inicial ante dichos estímulos se caracteriza por una

descarga generalizada del sistema nervioso simpático con la que se prepara al sujeto para huir ó luchar. Esto ocurre mediante la secreción de la hormona liberadora de corticotropina y arginina vasopresina hacia la glándula pituitaria para estimular la secreción de la hormona adrenocorticotropina al torrente sanguíneo. Esta última es conducida hacia las glándulas suprarrenales, en las cuales estimula la secreción de cortisol, que interacciona con receptores a glucocorticoides ubicados en varias áreas del sistema límbico. Por su parte, el sistema nervioso autónomo a través de la secreción de las catecolaminas adrenalina y noradrenalina causa varios efectos en el organismo tales como: elevación del ritmo cardíaco, estimulación de los músculos y la liberación de opioides analgésicos endógenos ^(55, 56, 57).

Se sabe que en la ansiedad hay una persistencia del sistema de alarma que ocurre de forma desproporcionada al estímulo adverso. Además del ambiente, contribuyen al padecimiento los factores genéticos y los fisiológicos.

3.1.2 Fisiopatología de la ansiedad

En la ansiedad se involucran una serie de sistemas de neurotransmisión y neuromodulación. Entre los más estudiados de forma farmacológica se encuentran el sistema gabaérgico y los monoaminérgicos ⁽⁵⁸⁾. El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor con acciones inhibitorias, por lo que controla los estados de excitabilidad en todas las áreas del cerebro. Su existencia en el tejido nervioso en interneuronas garantiza el equilibrio entre la excitación (actividad principalmente glutamatérgica) y la inhibición neuronal (actividad gabaérgica), un requisito

fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora. Si el balance de la actividad se encuentra favorecido por una mayor actividad de las vías gabaérgicas, entonces aparece sedación, amnesia y ataxia. Pero una reducción en la actividad del sistema gabaérgico resultará en excitación, ansiedad, intranquilidad, insomnio y reactividad exagerada ⁽⁵⁹⁾. Restaurar la función gabaérgica mediante medicamentos, tales como las benzodiazepinas, permite afirmar que alteraciones en la función gabaérgica son algunos de los sustratos fisiológicos de diversos trastornos de ansiedad ⁽⁶⁰⁾.

Otros sistemas de neurotransmisión relacionados con la ansiedad son el noradrenérgico y el serotoninérgico.

La noradrenalina es una catecolamina que incrementa sus niveles plasmáticos en situaciones de alerta. En el cerebro, las neuronas noradrenérgicas tienen sus somas en el *locus coeruleus*, estructura ubicada en el tronco encefálico y que recibe conexiones de la sustancia gris periacueductal, del núcleo del rafe dorsal, la sustancia gris periacueductal, el cerebelo, el núcleo paraventricular, el área pre-óptica, la hipófisis anterior, la región parabraquial, la amígdala, la corteza prefrontal medial y el núcleo paragigante celular; y emite eferencias a la médula espinal, la corteza prefrontal, la corteza motora primaria, la corteza somatosensorial, el hipocampo, el cerebelo y los núcleos del rafe dorsal, entre otros ⁽⁶¹⁾. La liberación de noradrenalina conduce a la ansiedad a través de una excitación excesiva o disfuncional. Su papel en el trastorno ha sido evidenciado por medio de fármacos que regulan la actividad noradrenérgica, que cuando se

administran durante periodos prolongados logran controlar el disparo de las neuronas noradrenérgicas produciendo efectos ansiolíticos ^(62, 63).

La serotonina es una indolamina cuyos cuerpos neuronales se ubican en los núcleos del rafe dorsal. Estos núcleos reciben la mayoría de sus aferencias del campo tegmentario lateral, el *locus coeruleus*, el *tuber cinereum* y la amígdala; y envían proyecciones a la corteza prefrontal, la corteza frontal, la corteza motora, la amígdala, el hipocampo y el septo ^(51, 64). La serotonina está implicada en funciones como la alimentación, el sueño, la vigilia y las respuestas de temor. Este neurotransmisor está implicado en la ansiedad, puesto que fármacos que causan la liberación aguda de serotonina producen efectos ansiogénicos ⁽⁶⁵⁾. A su vez, medicamentos que inhiben la recaptura de serotonina, aunque incrementan de forma aguda la ansiedad, después de un tratamiento de largo plazo producen efectos ansiolíticos después regularizar el disparo de las neuronas serotoninérgicas ⁽⁶⁴⁾.

3.1.3 Tratamientos farmacológicos para la ansiedad

El tratamiento para los trastornos de la ansiedad más elegido por los médicos es el farmacológico, ya que ha demostrado ser más efectivo y rápido que las terapias psicológicas ⁽⁶⁶⁾. Las benzodiacepinas y los antidepresivos son consumidos por pacientes de todas las edades, y su tasa de efectividad es del 50% ⁽⁶⁷⁾ sin embargo, una de las más grandes limitantes para su uso son los efectos adversos; las benzodiacepinas producen sedación, amnesia, mareos y depresión, además de tolerancia y síndrome de abstinencia, entre otros síntomas, y los antidepresivos cansancio, visión borrosa, insomnio y disfunciones sexuales ⁽⁶³⁾. Los principales

fármacos empleados para tratar los trastornos de la ansiedad se enlistan en la tabla 4 ⁽⁴⁹⁾. Los efectos adversos de los psicofármacos a menudo provocan que los pacientes dejen de seguir su tratamiento, esto ha generado la necesidad de emplear herramientas herbolarias, que se cree producen pocos efectos secundarios ⁽⁶⁸⁾, aunque no existe evidencia de esto.

Tabla 4. Principales terapias farmacológicas de los trastornos de la ansiedad			
Tipo	Ejemplos	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Benzodiacepinas	Diazepam, Clonazepam y Alprazolam entre otros.	Aumentan el rendimiento del receptor de GABA.	Disminución de la atención, amnesia anterógrada, fatiga, mareo y depresión entre muchos otros.
Antidepresivos ansiolíticos	Imipramina, Desipramina, Fluoxetina, β -carbolinas, etc.	Son fármacos antidepresivos de diversas clases (tricíclicos, inhibidores de la recaptura de serotonina, agonistas 5-HT-1A e inhibidores de la monoamino oxidasa), que poseen, además de su efecto antidepresivo, un efecto ansiolítico moderado.	Su indicación terapéutica y su toxicidad están determinadas por el mecanismo de acción que poseen.
Bloqueadores β -adrenérgicos	Propranolol.	El propranolol es un bloqueante β -adrenérgico, que sirve para disminuir los síntomas físicos de la ansiedad principalmente.	Efectos colaterales menores como extremidades frías, trastornos gastrointestinales, disturbios del sueño, laxitud y fatiga son a menudo pasajeros y algunos pacientes presentan alteraciones del estado de ánimo.

Adaptada de Rodríguez, 1998.

3.1.4 Remedios herbolarios para la ansiedad

Muchos remedios herbolarios son empleados para la ansiedad a menudo en forma de infusión, aunque no todos poseen una alta potencia farmacológica o se encuentran validados por estudios científicos. Entre los más usados se

encuentran: Pasiflora (*Passiflora sp.*), Melisa (*Melissa officinalis*), Toronjil (*Agastache mexicana*), Valeriana (*Valeriana officinalis*), Manzanilla (*Matriacaria recutita*) y Ginko (*Gingko sp.*), entre otras ^(69, 70). El único remedio herbolario que ha demostrado poseer potencia, eficacia clínica y que está recomendado por la OMS es el rizoma pelado del Kava (*Piper methysticum*) ^(52, 68, 69, 70).

3.2 Trastornos depresivos

La depresión es un síndrome con varios subtipos (Distimia, depresión mayor y trastorno depresivo no especificado, principalmente) que consiste en grupos de síntomas o signos que reflejan el deterioro de una variedad de procesos afectivos, somáticos y cognitivos ^(54, 71). Se caracteriza por un descenso en el estado de ánimo (tristeza), agitación ó retardo psicomotriz, disminución de la capacidad de concentración, incapacidad para experimentar placer (anhedonia), disminución de la persistencia, sentimientos de culpa, perturbaciones en la ingesta de comida y alteraciones del sueño y la alimentación ⁽⁷²⁾. El síntoma más alarmante son las ideas de muerte o suicidio, y la consumación de éste. La depresión es un trastorno crónico y discapacitante que genera disfunción social, e incrementa el riesgo de padecer enfermedades como el Alzheimer o las cardiovasculares ⁽⁵⁾.

3.2.1 Etiología de los trastornos depresivos

La etiología de la depresión es multifactorial, ya que en su desarrollo y curso participan factores como los genéticos, los del medioambiente social y cultural, y los fisiológicos ⁽⁷³⁾.

Se cree que a nivel fisiológico la depresión tiene sus orígenes es una baja concentración de neurotransmisores monoaminérgicos provocada por herencia, o eventos altamente estresantes ⁽⁷⁴⁾.

Sin embargo, evidencias recientes sugieren que el comienzo de la depresión podría deberse en parte a problemas en el procesamiento de la información dentro de las redes neuronales y que posiblemente los fármacos antidepresivos inducen cambios plásticos en la conectividad neuronal ⁽⁷⁵⁾.

3.2.2 Fisiopatología de la depresión

La principal hipótesis del origen fisiológico de los trastornos de la depresión, es la teoría monoaminérgica que indica que una baja concentración de monoaminas en los espacios sinápticos podría ser la causa de la depresión en humanos y que el uso de fármacos que aumentan la disponibilidad de estos neurotransmisores ayuda al paciente a recuperar un estado de ánimo balanceado, como se explica en la figura 7 ^(75, 76).

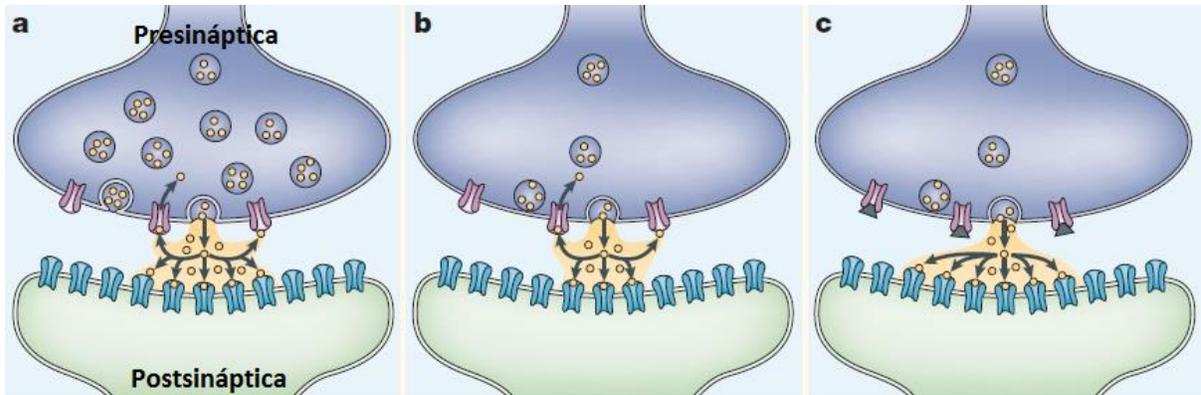


Figura 7. Mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos. a) Los neurotransmisores monoaminérgicos (amarillo) son liberados en el espacio presináptico y se unen a los receptores de la neurona post-sináptica; La transmisión finaliza cuando las monoaminas son recapturadas. b) En la depresión hay una baja concentración de monoaminas disponibles. c) Los fármacos (gris) que bloquean los sitios de recaptura de las monoaminas aumentan la concentración de neurotransmisores disponibles. Fuente: Castrén, 2005.

En la figura 8, se esquematiza la hipótesis de las redes neuronales en la depresión, que dice que las fallas en el procesamiento de la información podrían ser la causa de la depresión, y que el uso de fármacos aumenta la conectividad en estas redes neuronales a través de cambios plásticos. Estas redes son finalmente estabilizadas por medio de la poda neuronal ⁽⁷⁵⁾.

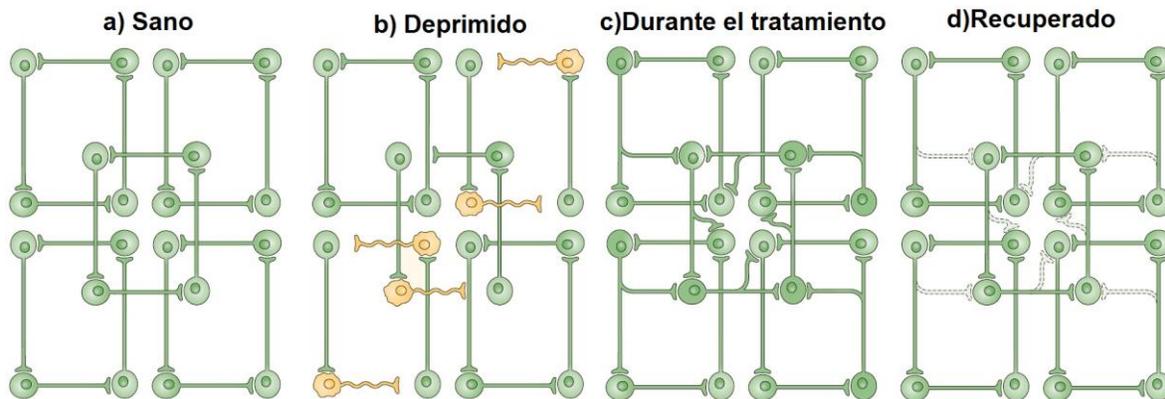


Figura 8. Hipótesis de redes neuronales de la depresión. a) En el cerebro sano la información es procesada en redes neuronales parcialmente traslapadas. b) En la depresión, este procesamiento no funciona adecuadamente en algunas redes. c) El tratamiento con antidepresivos mejora la conectividad en redes neuronales. d) Por medio de una poda neuronal se seleccionan y estabilizan las sinapsis y redes que están activas. Castrén, 2005.

3.2.3 Tratamientos farmacológicos para la depresión

Se ha propuesto que las disfunciones y anormalidades de las vías de los neurotransmisores y receptores de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA), dan origen a distintas formas de la depresión. Así por ejemplo los trastornos depresivos más leves como la distimia están asociados a fallas en el sistema serotoninérgico, los trastornos depresivos que incluyen alteraciones psicomotoras como aletargamiento general podría ser causado principalmente por fallas en las vías noradrenérgicas y finalmente un fallo en las vías dopaminérgicas provocaría estados depresivos con rasgos psicóticos ⁽⁷⁷⁾.

Para el tratamiento de las variantes más severas de la depresión se emplea una combinación de intervenciones psicológicas y farmacológicas, que pueden incluir alguno de los siguientes 4 tipos de medicamentos: Antidepresivos tricíclicos (ATC), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), inhibidores de la recaptura de noradrenalina y serotonina (IRNS), e inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO) su indicación terapéutica y toxicidad está determinada por el mecanismo de acción que poseen ⁽⁷⁶⁾. En general, todos estos fármacos incrementan de forma selectiva, preferencial, o mixta, a las monoaminas cerebrales. Los inhibidores selectivos actúan sobre las proteínas transportadoras de cada monoamina, bloqueando la actividad de recaptura de la sinapsis a la presinápsis. Mientras que los IMAO inhiben la actividad de la enzima mitocondrial que presinápticamente degrada a las monoaminas. El resultado en ambos casos es una mayor concentración de la monoamina en la sinapsis. Lamentablemente, estos fármacos no son efectivos en todos los casos, de todos los pacientes que

logran responder al tratamiento, un 25%-50% tendrán síntomas residuales y en su gran mayoría recaerán en la enfermedad, es por eso que se necesita tener más medicamentos incluyendo remedio herbolarios y aquellos que se consideran alternativos ⁽⁷⁸⁾.

3.2.4 Remedios herbolarios para la depresión

El principal remedio herbolario empleado en la clínica es el Pericón ó Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) ^(70, 79). El mecanismo de acción de este remedio herbolario es como inhibidor de la recaptación de monoaminas ⁽⁸⁰⁾.

3.2.5 Comorbilidad con ansiedad

Se sabe que los trastornos depresivos tienen comorbilidad con los trastornos de la ansiedad en el 50% de los sujetos con depresión mayor ⁽⁸¹⁾, muchos de los síntomas de ambos trastornos mentales son compartidos, mientras que otros son exclusivos de cada desorden (tabla 5). En estos pacientes el tratamiento ideal sería aquel que pudiera reducir la gravedad de ambos síndromes, para evitar recaídas.

Tabla 5. Dimensiones conductuales traslapadas en ansiedad y depresión					
Dimensiones traslapadas		Dimensiones de la depresión		Dimensiones de la ansiedad: "Hiperestimulación"	
Presente en ansiedad y depresión	Ira, fatiga, irritabilidad, hostilidad, baja concentración, sentimiento de pérdida de control, angustia.				
Más común en depresión	Tristeza, desesperación, culpa, sentimiento de inutilidad, ideación suicida.	Más común en depresión	Anhedonia, falta de interés, lucha con el ambiente externo, retardo psicomotriz, sentimiento de impotencia.	Más común en ansiedad	Falta de aliento, mareos, asfixia, dolor de pecho, palpitaciones, náuseas, sudoración, temblores, escalofríos, bochornos.
Más común en ansiedad	Miedo, impotencia, inquietud, ansiedad, terror, impulsividad, reactividad excesiva.				

Adaptada con datos de Frazer, 2005.

A la fecha continua la investigación de nuevas moléculas que pudiera ser de utilidad en el tratamiento de estos desórdenes comórbidos.

3.2.6 Trayectoria de atención seguida por pacientes con ansiedad y depresión en México

La mayoría de las personas con trastornos de la ansiedad y la depresión en México establecen el primer contacto con un médico general, como se indica en la figura 9 y casi todos los casos concluyen su camino asistencial con el uso de los recursos proporcionados por las medicinas alternativas o la medicina tradicional⁽⁸²⁾, es por eso que es importante estudiar de manera formal estos recursos, que incluyen remedios herbolarios, empleados como tratamiento complementario o alternativo.

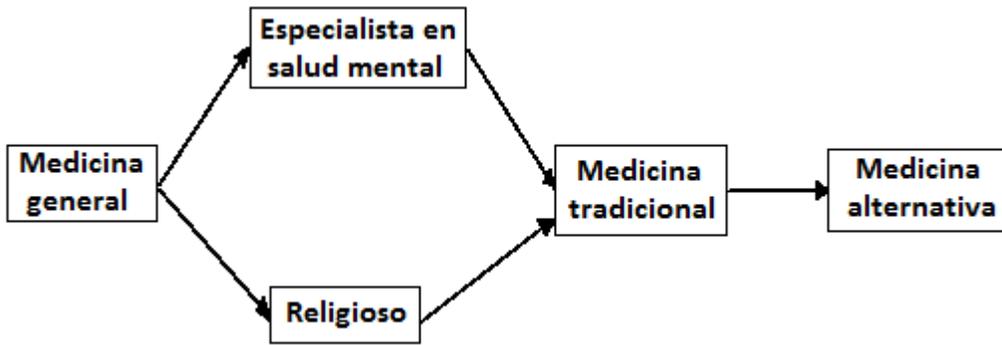


Figura 9. Diagrama de la trayectoria de atención seguida por la mayoría de los pacientes con ansiedad y depresión en México.

Pruebas en animales para el estudio de trastornos mentales

Los animales de laboratorio se emplean para conocer la etiología, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano ^(83, 84) ya que por razones éticas es imposible realizar investigación de este tipo en seres humanos. Las similitudes entre el SNC de la especie humana con el de otros mamíferos permite que los resultados obtenidos en ratas, ratones o monos, conduzcan al planteamiento de hipótesis del fenómeno de la depresión o la ansiedad en humanos. Los modelos animales de ansiedad o depresión son preparaciones experimentales desarrolladas y validadas en una especie animal, con el objetivo de estudiar la fisiopatología o los tratamientos para estos desordenes. Se usan como pruebas de detección de nuevos fármacos o intervenciones, o para la elucidación de mecanismos de acción asociados a los efectos farmacológicos ⁽⁷²⁾.

4.1 Validación de pruebas conductuales para uso en la investigación

Aunque los ensayos conductuales en animales no sean totalmente congruentes con la condición humana, dado que los trastornos mentales son síndromes complejos, es conveniente emplear pruebas que modelen sólo algunas de sus dimensiones conductuales ⁽⁷¹⁾. Para el uso en experimentación, las pruebas en animales deben cumplir con criterios mínimos para ser considerados validos ⁽⁸⁵⁾, cada parámetro de validación ha sido definido brevemente en la tabla 6.

Tabla 6. Validación de pruebas conductuales en animales para la investigación de los trastornos mentales

Criterio	Definición
Validez de apariencia	Se refiere a que los animales presenten signos que sean análogos a los presentes en el trastorno
Validez de predicibilidad	Es cuando el modelo es capaz de responder positivamente a los tratamientos que son efectivos en la clínica y que, inversamente, no responde a los tratamientos que son inefectivos, para el farmacólogo industrial es el parámetro de validación más importante.
Validez etiológica	Que los estímulos empleados para generar las conductas sea la misma en el modelo animal y en el ser humano.
Validez de mecanismo	Existe cuando el modelo involucra procesos neuroquímicos similares a los presentes en el ser humano.

Adaptada de Anisman, 2005.

4.2 Pruebas en animales para el estudio de la ansiedad y la depresión

Los modelos animales de ansiedad se basan principalmente en medir conductas de ataque/huida que son provocadas y medidas en las ratas mediante estímulos ó eventos estresantes tales como: espacios abiertos, precipicios y objetos que tengan corriente eléctrica moderada, entre otros ⁽⁸⁶⁾. De esta manera se generan respuestas bioquímicas y conductuales semejantes a las presentadas por sujetos con ansiedad ⁽⁸⁷⁾. En el presente estudio se emplearon como pruebas de ansiedad la prueba de LEC y la prueba de ED, y para detectar el efecto tipo antidepresivo se empleó la PNF. En la tabla 7, se explican los fundamentos de cada modelo animal, así como los efectos de algunos fármacos sobre la conducta modelada.

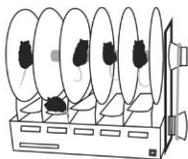
4.3 Pruebas en animales para el estudio de la actividad locomotriz

El actímetro y el rota-rod son empleados para evaluar la locomoción de los animales bajo los efectos de fármacos ⁽⁸⁸⁾.

La prueba de actividad locomotriz (AL) en actímetro recaba información que nos sirve para medir cuantitativamente la actividad espontánea del animal, y así descartar posibles efectos estimulantes o sedantes del fármaco. El Rota-rod es útil para cuantificar posibles efectos colaterales de fármacos, en el balance y la coordinación motora en general por medio de la cuenta del número total de caídas de un rollo giratorio ⁽⁸⁹⁾.

Tabla 7. Fundamento de las pruebas conductuales realizadas

Rota-Rod



Se emplea para detectar deterioros en la actividad motriz provocados por el fármaco al que se le está realizando el escaneo. La prueba es un indicador sensible a traumas inducidos por daño cerebral en la ratas, como por ejemplo el alcohol, el cual discapacita notablemente a la rata en esta prueba; permite detectar si un fármaco afecta la coordinación motora del animal contando el número de caídas de un rollo giratorio en un lapso corto de tiempo ⁽⁸⁸⁾.

Actímetro



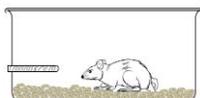
Se basa en que se está introduciendo a la rata en un ambiente novedoso para el animal, diferente a su caja de alojamiento, por lo que el animal puede experimentar "agorafobia". En esta prueba se mide la actividad exploratoria y/o ambulatoria al ambiente nuevo. La prueba sirve para detectar efectos sedantes, estimulantes o estereotipias ⁽⁸⁸⁾.

Laberinto elevado en cruz



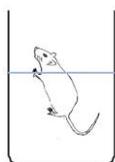
Esta prueba es usada como herramienta para evaluar el efecto ansiolítico de nuevos fármacos. Se basa en que las ratas tienen de manera natural miedo a los espacios abiertos. En el laberinto se expone al animal a un conflicto entre permanecer "a salvo" en brazos cerrados, ó explorar un ambiente novedoso. El tiempo que el roedor permanece en los brazos abiertos está asociado a una disminución en la ansiedad, ya que los fármacos ansiolíticos son capaces de aumentar esta conducta exploratoria ⁽⁹⁰⁾.

Enterramiento defensivo



Una de las respuestas innatas de lucha de las ratas hacia una amenaza incluye la acción de enterrar el estímulo adverso, con el fin de que ya no represente un riesgo. En el laboratorio el estímulo adverso es un electrodo que libera corriente eléctrica, y que estimula la expresión de la conducta de enterramiento. Los fármacos ansiolíticos son capaces de reducir el tiempo que pasa el roedor enterrando estos objetos. Esta prueba permite además detectar la presencia de efectos sedantes, analgésicos y/o amnésicos que son indeseables ^(72, 88, 91, 92).

Nado Forzado



Cuando se fuerza a las ratas a nadar en pequeños cilindros de los cuales no hay escape, se vuelven rápidamente inmóviles después de un periodo inicial de actividad vigorosa en el que intentan escapar, esta conducta se denomina "indefensión aprendida". La inmovilidad se interpreta como evidencia de que los sujetos de experimentación han aprendido que el escape es imposible y han perdido toda esperanza. La inmovilidad, asociada a la indefensión aprendida, es reducida significativamente por numerosos antidepresivos efectivos en la clínica, por eso esta prueba es empleada ampliamente para pruebas de escaneo de actividad antidepresiva ^(93, 94).

Tabla elaborada con datos de Fernández 1999, Rodgers 1997, Treit 1981, Willner 1991, De Boer 2003, Porsolt 1977 y Detke 1995.

4.4 Efecto de fármacos ansiolíticos y antidepresivos en las pruebas de LC, ED, y nado forzado

En la literatura existe un gran número de reportes sobre la efectividad y potencia relativa de fármacos ansiolíticos y/o antidepresivos en los modelos utilizados en la presente tesis. Los trabajos reportan los efectos de tratamientos con efectividad clínica cuyos efectos han sido bien caracterizados en dichos modelos, así como de terapias no farmacológicas como la privación de sueño REM, el electrochoque y la estimulación magnética transcraneal. En las tablas 8, 9 y 10 se citan algunos ejemplos. Para el caso de la PNF se ha descrito su utilidad para elucidar mecanismos de acción en los cuales participan las monoaminas. Así, fármacos con actividad serotoninérgica o noradrenérgica, diferencialmente afectan las conductas de esfuerzo (nado o escalamiento), además de reducir la indefensión aprendida ⁽⁹⁴⁾.

Tabla 8. Efecto de los fármacos en la prueba de LEC

Ansiedad: Laberinto elevado en cruz								
Fármaco	TBA	TBC	TC	EBA	EBC	CRS	IC	Referencias
Clordiazepóxido	↑	-	-	↑	-	-	↑	95, 96, 97, 98
Diazepam	↑	-	-	↑	-	-	↓	95, 99, 100
Alprazolam	↑	-	-	↑	-	-	↑	98
Buspirona	↑	-	-	-	-	↓	↑	101, 102
Ipsapirona	-	-	-	-	-	↓	-	101, 102
Ketanserina	-	-	-	-	-	↓	-	101
Imipramina	-	-	-	-	-	-	-	101, 103
Desipramina	-	-	-	-	-	-	-	104
Reboxetina	↑	-	-	-	-	-	-	105

↑, aumento; ↓, disminución; -, sin cambios ó sin datos disponibles, TBA, tiempo en brazo abierto; TBC, tiempo en brazo cerrado; TC, Tiempo en centro; EBA, entradas a brazo abierto; EBC, entradas a brazo cerrado; CRS, cruces; IC, inmersiones de cabeza; Las líneas horizontales agrupan los fármacos de acuerdo a su mecanismo de acción.

Tabla 9. Efecto de los fármacos en la prueba de ED

Ansiedad: Enterramiento defensivo					
Fármaco	Latencia	Tiempo de enterramiento	Choques	Acercamientos al electrodo	Referencias
Diazepam	↑	↓	-	↓	91, 106, 107
Clordiazepóxido	↑	↓	↑	-	91, 108, 109, 110, 111, 112, 113
Midazolam	-	↓	↑	-	114
Pentobarbital	-	↓	↑	-	91, 114
Etanol	-	↓	-	-	114
Tolueno	↑	↓	-	-	115
Buspirona	-	↓	↑	-	91, 116, 117, 118
Flesinoxan	-	↓	-	↓	119, 120
Ipsapirona	↓	↓	-	-	118, 121, 122, 123
Imipramina	-	-	-	-	111
Desipramina	-	↓*	-	-	88, 124, 125
Yohimbina	-	-	-	-	114

↑, aumento; ↓, disminución; -, sin cambios ó sin datos disponibles; *, en hembras ovariectomizadas ó crónico; Las líneas horizontales agrupan los fármacos de acuerdo a su mecanismo de acción.

Tabla 10. Efecto de los fármacos en la PNF

Depresión: Nado forzado				
Fármaco	Inmovilidad	Nado	Escalamiento	Referencias
Fluoxetina	↓	↑	-	94, 115, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136.
Sertralina	↓	↑	-	94
Paroxetina	↓	↑	-	94
Fluvoxamina	↓	↑	-	137
Indorenato	↓	↑	-	138, 139
Desipramina	↓	-	↑	94, 115, 124, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 142
Maprotilina	↓	-	↑	94
Reboxetina	↓	↓	↑	143

↑, aumento; ↓, disminución; -, sin cambios ó sin datos disponibles; Las líneas horizontales agrupan los fármacos de acuerdo a su mecanismo de acción.

Planteamiento del problema

Calea zacatechichi es una especie empleada en la medicina tradicional en México para tratar diversos padecimientos entre los que destacan “curar los nervios”, como “estimulante cerebral” y para “aguzar los sentidos” ⁽¹⁴⁴⁾. Los estudios cualitativos en humanos reportaron que su consumo produce posibles efectos tranquilizantes e hipnóticos, y eleva el estado de ánimo. Estudios en animales demostraron que extractos orgánicos de la planta modifican la actividad eléctrica cerebral en gatos, en áreas del sistema límbico, que se encuentra asociado a la expresión y control de las emociones. *Calea zacatechichi* contiene sesquiterpenlactonas y flavonoides. Algunos compuestos de este tipo han demostrado poseer actividad tipo ansiolítica y antidepresiva en roedores. Sin embargo, se desconoce si esta planta es capaz de producir efectos de tipo ansiolítico y/o antidepresivo. Hasta el momento no se han realizado estudios sistemáticos en los que se determine su actividad en modelos animales de conducta depresiva o conducta ansiosa. Tampoco se ha analizado si los efectos de esta planta pueden ser inducidos mediante un extracto acuoso, considerando que ésta es consumida en diferentes comunidades principalmente en infusión.

Hipótesis

Si *Calea zacatechichi* produce en humanos mejoría transitoria del estado de ánimo y efectos tranquilizantes, entonces un extracto acuoso de esta especie producirá efectos semejantes a los de fármacos ansiolíticos y antidepresivos convencionales en modelos animales de estos trastornos.

Objetivo general

Determinar si el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce efectos ansiolítico y/o antidepresivo en modelos animales.

Objetivos particulares

Determinar si el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce un efecto tipo ansiolítico en las pruebas de laberinto elevado en cruz y enterramiento defensivo.

Determinar si el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce un efecto tipo antidepresivo en la prueba de nado forzado.

Determinar si el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* induce alteraciones en la actividad y coordinación motriz, en las pruebas de campo abierto y rollo giratorio.

Material y métodos

6.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio de acuerdo a la clasificación de Sampieri, Fernández y Baptista ⁽¹⁴⁵⁾ que es: a) experimental, por que se analizó el efecto de un tratamiento y diferentes dosis de éste (variable independiente) sobre variables dependientes; y b) transversal, por que se recolectaron los datos en grupos independientes de sujetos.

6.2 Población de estudio

Se utilizaron 86 ratas macho de cepa Wistar, adultas (3-7 meses de edad), con un peso promedio de 400 g de peso. Todos los animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Los animales fueron alojados en condiciones estándar de laboratorio según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 ⁽¹⁴⁶⁾, en un cuarto con un ciclo invertido de luz-oscuridad, de 12 x 12 h (luces a las 22:00 h), temperatura controlada (25 ± 1 °C) y agua y alimento (Purina Rat Chow) *ad libitum*. Los animales fueron alojados en grupos de 5 ratas por caja (50 x 40 x 20 cm).

6.3 Criterios de inclusión: Ratas macho albinas, de la cepa Wistar, en promedio de 5 meses de edad, vírgenes a tratamiento y manipulación, excepto aquella para su cuidado.

6.4 Criterios de exclusión: Ratas que hayan adquirido enfermedades como otitis ó infestaciones no tratadas de ácaros, lesiones que les impida ser administradas oralmente, defectos que les impida desempeñarse en las pruebas.

6.5 Criterios de eliminación: Ratas con desempeño errático en las pruebas realizadas, asociado a enfermedad no identificada antes del inicio del experimento.

Variables. Las medibles en cada prueba conductual realizado

p. ej.: inmovilidad, escalamiento y nado en la PNF.

Técnicas

6.6 Obtención del material vegetal y preparación del extracto acuoso de *Calea zacatechichi*.

El material vegetal seco fue adquirido con el proveedor comercial Aztecasplants de México, S.A. de C.V.; antes de su extracción fue necesario realizar un separado manual para retirar impurezas vegetales y minerales presentes en el material adquirido. El extracto fue preparado moliendo 100 g de material seco de las partes aéreas de la planta, calentándolo a 100 °C en agua destilada durante 10 minutos, filtrado por gravedad y liofilizado. Se obtuvo un rendimiento del 22.5996%. El extracto acuoso fue proporcionado por el laboratorio de Fitofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM).

El liofilizado del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* fue disuelto en solución salina isotónica (S.S.I.) como diluyente (NaCl 0.9% m/v), para preparar las

diferentes dosis de la sustancia. Todos los animales fueron administrados oralmente considerando un volumen de 1 mL/kg de peso corporal ⁽¹⁴⁷⁾. Para el grupo control se empleó S.S.I.

6.7 Experimentos

6.7.1 Experimento 1. Estudio piloto mediante tamizaje farmacológico

Se administró oralmente a las ratas el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* a dosis de 1000 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, o SSI como control. Por cada dosis se emplearon de 2-4 ratas. Inmediatamente después de la administración, el efecto del tratamiento agudo (una administración) se evaluó en una “arena” o cilindro de acrílico de 90 cm de diámetro por 50 cm de alto, con papel plastificado en la parte inferior o con aserrín (figura 10). Se videograbó el comportamiento de los sujetos por 2 h y cada video fue analizado de manera descriptiva anotando los comportamientos que fueran indicativos de la presencia de actividad en el SNC como son: somnolencia, ataxia, piloerección, acicalamiento, estereotipias, convulsiones e hiperactividad, entre otros ^(148, 149).

Se realizaron las siguientes observaciones a algunos animales, a intervalos de tiempo de 30, 60 y 90 minutos: a) prueba de rejilla invertida colocando al animal sobre una reja de manera horizontal girándola 180° sobre su eje para buscar posibles efectos del extracto sobre músculo, midiendo el tiempo que tarda en caer la rata; b) registro de la temperatura corporal, con el fin de buscar posibles efectos sobre el sistema nervioso autónomo; c) prueba de campo abierto, en una caja de acrílico dividida en 9 recuadros se midió el número total de cruces y de paradas

en un periodo de 5 minutos; finalmente d) índice de diarrea propuesto por Malone⁽¹⁴⁹⁾, y llevado a cabo en la “arena”.

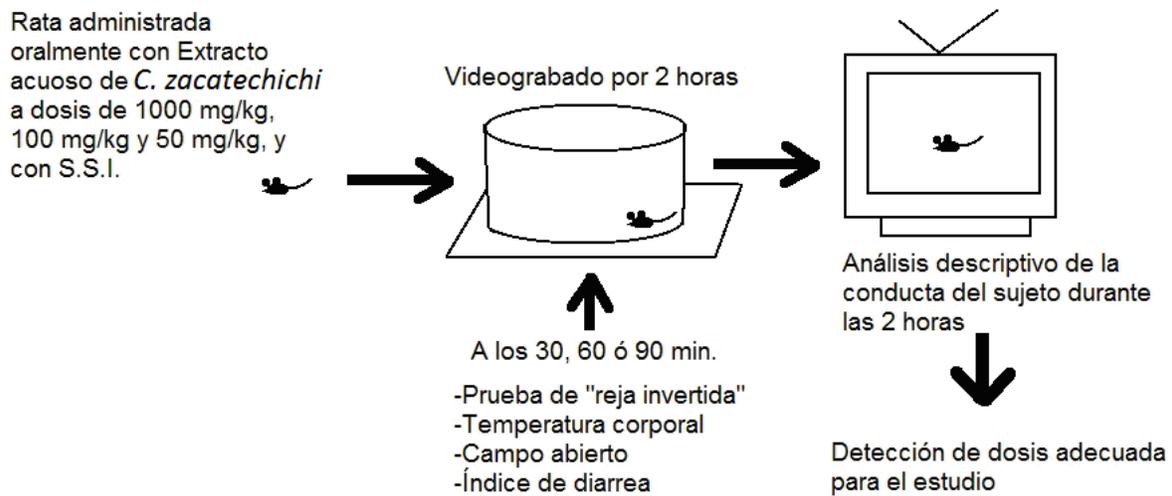


Figura 10. Tamizaje farmacológico para detección de la dosis adecuada para el estudio.

Con el estudio piloto (tamizaje farmacológico) se obtuvo información para las dosis del estudio en las pruebas de conducta específica.

6.7.2 Experimento 2. Caracterización del efecto terapéutico del extracto en modelos animales de ansiedad o depresión

Para este experimento se usaron grupos independientes de ratas que fueron tratadas con diferentes dosis del extracto. Se realizó un tratamiento subcrónico (ver figura 11) que consistió en 3 administraciones (vía oral) del extracto, a las 24, 5 y 1 h antes de las pruebas de ansiedad o depresión. Esta administración subcrónica⁽⁹⁴⁾ se eligió con base en su efectividad para producir efecto de tipo antidepressivo en la PNF^(133, 136). La administración subcrónica de fármacos también se ha utilizado para generar efectos ansiolíticos en algunas pruebas conductuales⁽¹⁵⁰⁾.

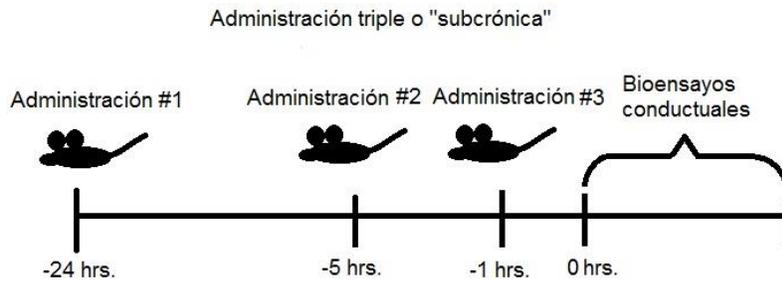


Figura 11. Diagrama del tratamiento subcrónico adaptado del método de Martínez-Mota 2008.

6.7.3 Baterías de pruebas conductuales

Las ratas fueron evaluadas en una batería, como se muestra en la figura 12, para detectar los efectos ansiolíticos, antidepresivos y motores. Se ha demostrado que la aplicación de pruebas de conducta en batería no modifica de forma significativa los resultados (88, 151).

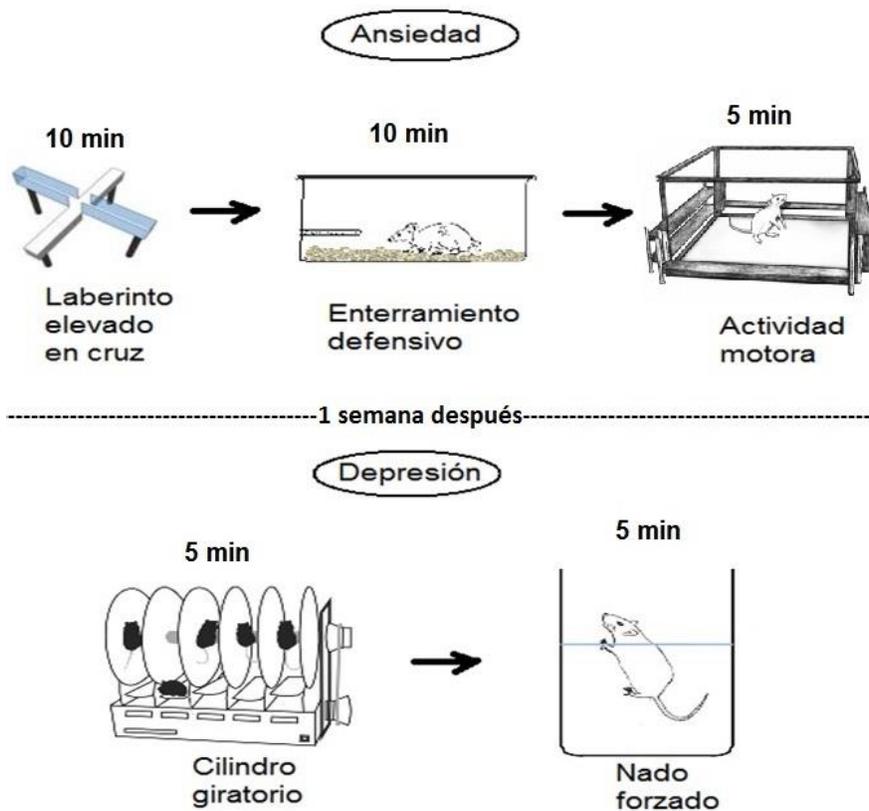


Figura 12. Esquema de baterías de pruebas para ansiedad y depresión.

En una primera sesión, las ratas fueron evaluadas en las pruebas de LEC, ED y AL con el fin de medir los efectos ansiolíticos y sobre la actividad motriz producidos por el extracto. Se permitió una semana de lavado antes de volver a realizar la administración del extracto de forma totalmente aleatorizada.

En la segunda fase las ratas fueron evaluadas en Rota-rod y PNF para detectar los efectos sobre la coordinación motriz, así como posibles efectos antidepresivos.

El registro de las pruebas de ansiedad y de actividad locomotora se realizó en un cuarto oscuro, iluminado con luz roja (10 W) y sonoamortiguado. El registro en el rota-rod y la PNF se realizó en un cuarto iluminado con luz blanca fosforescente (65 W) aislado parcialmente y con acceso al servicio de agua.

6.7.4 Prueba de laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz es un dispositivo de acrílico formado por 4 brazos de 50 x 10 cm cada uno, los cuales están colocados en forma de cruz, sobre una plataforma elevada 50 cm por encima del suelo. Dos brazos están cerrados por paredes de 40 cm de altura mientras que los otros dos carecen de protección. El animal fue colocado en el centro del laberinto, con la cara dirigida a uno de los brazos abiertos, a partir de ese momento su conducta fue videograbada por 10 minutos con una cámara colocada por arriba del mismo. Se analizó el número de veces que el animal entró a los brazos abiertos (EBA) y cerrados (EBC), así como el número de cruces en el laberinto. También se registró el tiempo que pasó en los brazos abiertos (TBA), cerrados (TBC), y en el centro del laberinto (TC). Se considera que un animal ha entrado a uno de los brazos cuando posa las cuatro

patas en ese espacio. Se analizó un parámetro considerado etológico: El número de veces que realizó “inmersiones de cabeza” (IC), definido como los episodios en los que el animal se coloca en el centro del laberinto e introduce la cabeza en el espacio donde termina uno de los brazos abiertos y comienza uno de los cerrados en actitud explorativa del vacío hundiendo su cabeza ⁽⁸⁸⁾, los resultados se interpretaron de acuerdo a los datos indicados en la tabla 11.

Tabla 11. Interpretación de las conductas medidas en la prueba de LEC

Conducta	Interpretación
Tiempo en brazo abierto	Es el principal parámetro usado para medir el efecto tipo ansiolítico de fármacos en esta prueba, un aumento en el tiempo total que pasa el animal en los brazos abiertos refleja una mayor actividad ansiolítica ^(95, 101) .
Tiempo en brazo cerrado	Una disminución en el tiempo que pasa el animal en el brazo cerrado puede ser un reflejo indirecto del efecto ansiolítico de un fármaco ⁽⁹⁵⁾ .
Tiempo en el centro.	Refleja de manera directa el tiempo que el animal pasa mostrando conductas de evaluación del riesgo, un aumento significa que el fármaco aumenta estas conductas y no refleja necesariamente un efecto ansiolítico ⁽⁹⁰⁾ .
Entradas a brazo abierto	Un aumento de entradas a este brazo es un indicador de un efecto ansiolítico ^(95, 101) .
Entradas a brazos cerrados	Una disminución de entradas a brazo cerrado puede ser el reflejo de actividad ansiolítica ⁽⁹⁵⁾ .
Cruces	El aumento en los cruces refleja un aumento en la conducta exploratoria del animal o pueden ser indicio de un efecto estimulante. La disminución del número de cruces sugiere efectos tipo sedativo ⁽⁹⁵⁾ .
Inmersiones de cabeza	La exploración inmersiva del vacío es una conducta de evaluación del riesgo del tipo atrevida u osada, que es aumentada por ansiolíticos, principalmente por fármacos de acción serotoninérgica, por lo que un incremento en el número de esta conducta se interpretará como un claro efecto ansiolítico ^(95, 101) .

Interpretación de las conductas medidas en la prueba de Laberinto elevado en cruz. Elaborada con datos de Griebel 1997, Pellow 1985 y Rodgers 1997.

6.7.5 Prueba de enterramiento defensivo

Se colocó a cada animal, dentro de una caja rectangular de acrílico transparente, de 25 x 30 cm superior y de 25 x 18 cm inferior, con tapa metálica. La caja tiene un electrodo conectado a un estimulador que libera choques eléctricos de

intensidad moderada (0.3 mA). El piso está cubierto de una capa de viruta finamente molida, de 5 cm de profundidad. Se introdujo al animal en una de las esquinas contrarias al electrodo y se registró su actividad en video durante 10 minutos. Las conductas analizadas en los videos registrados fueron: el tiempo que tarda el animal en recibir el primer shock (LAT), número total de choques recibidos (CHO) y la suma de tiempo total que el animal pasó enterrando con aserrín el electrodo (ENT), también se contaron los “acercamientos al electrodo” (AE) que es cuando, después de haber recibido la descarga, el animal explora de cerca olfateando el electrodo sin recibir descarga ⁽⁸⁸⁾ los resultados se interpretaron de acuerdo a los datos indicados en la tabla 12.

Tabla 12. Interpretación de las conductas medidas en la prueba de ED

Conducta	Interpretación
Tiempo total de enterramiento	Es el principal parámetro usado para medir el efecto tipo ansiolítico en esta prueba. Una disminución significa que el fármaco empleado está disminuyendo el miedo o la ansiedad que el animal expresa como evitación activa del estímulo adverso ^(91, 92, 122) .
Latencia de enterramiento	La latencia de enterramiento se ve alargada por ansiolíticos y no necesariamente refleja un efecto tipo ansiolítico, más bien puede reflejar una disminución de la reactividad del animal ante estímulos adversos ⁽⁹²⁾ .
Acercamientos al electrodo	El aumento en la exploración dirigida hacia el electrodo después del primer choque refleja de manera directa un incremento en el despliegue de conductas de evaluación del riesgo ⁽⁹²⁾ .
Choques	Un aumento en el número de choques está asociado a un efecto analgésico. Otros reportes indican que algunos agentes que dañan la memoria incrementan drásticamente el número de choques recibidos ⁽⁹²⁾ .

Interpretación de las conductas medidas en la prueba de enterramiento defensivo. Elaborada con datos de Korte, 1991; Treit, 1981 y De Boer, 2003.

6.7.6 Prueba de nado forzado

Las ratas fueron colocadas individualmente en cilindros de vidrio de borosilicato de 21 cm de diámetro x 46 cm de altura (Pyrex[®]), llenados a 30 cm de altura con agua del grifo, a 23-25 °C. Los animales fueron colocados ahí por 15 minutos. Esta primera sesión se denomina pre-prueba y es utilizada para inducir la conducta de desesperanza (o indefensión aprendida). Al finalizar las ratas fueron secadas y colocadas en su caja-hogar. Después de 24 h se realizó la prueba, colocando al animal en las mismas condiciones del cilindro, por 5 minutos. Esta sesión de prueba fue videograbada y se registró la conducta del animal desde arriba del cilindro. La conducta fue analizada con una técnica de registro instantáneo, mediante el cual se registra la actividad predominante en cada intervalo de 5 s, pudiendo ser: inmovilidad (INM), nado (NAD) ó escalamiento (ESC). Inmovilidad se define como los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote, nado son los movimientos activos de braceo, con desplazamiento alrededor del cilindro, y escalamiento es una conducta activa dirigida contra las paredes del cilindro con intentos de trepado de las paredes del estanque, cuyos movimientos severos a menudo generan burbujeo ^(94, 136) los resultados se interpretaron de acuerdo a los datos indicados en la tabla 13.

Tabla 13. Interpretación de las conductas medidas en la PNF

Conducta	Interpretación
Inmovilidad	La inmovilidad es directamente proporcional a la indefensión aprendida. Los fármacos antidepresivos que son efectivos clínicamente, disminuyen este parámetro de manera consistente ^(93, 94, 152) .
Nado	Los fármacos cuyo mecanismo de acción es de tipo serotoninérgico, logran la disminución en la inmovilidad de forma paralela a un aumento del nado. Un aumento en esta conducta refleja entonces que un fármaco en desarrollo podría interactuar con el sistema de la serotonina ^(115, 126, 152) .
Escalamiento	Los fármacos cuyo mecanismo de acción es de tipo noradrenérgico logran la disminución en la inmovilidad junto con un aumento del escalamiento. Un aumento en esta conducta sugiere que un fármaco tiene actividad en la vía dopaminérgica, noradrenérgica, o en ambas ^(94, 127, 152) .

Elaborada con datos de Porsolt 1977, Cryan 2005, Olivares-Nazario 2015, Detke 1995, López- Rubalcava 2000 y Martínez-Mota 2004.

6.7.7 Prueba de actividad locomotora en campo abierto

Se colocó a cada animal en un actímetro automatizado, que consiste en una caja de acrílico (medidas) con monitor de actividad motora infrarrojo modelo LE 881 IR, para registrar su actividad durante 5 minutos. Los resultados de número de paradas, actividad espontánea general y estereotipias ⁽⁸⁸⁾ se interpretaron de acuerdo a la tabla 14.

Tabla 14. Interpretación de la conducta en la prueba de CA

Conducta	Interpretación
Ambulación	Un descenso en el tiempo que pasa el animal moviéndose puede indicar sedación general ^(153, 154) ; un aumento en la ambulación sólo representa un efecto estimulante ⁽¹⁵⁴⁾ .
Paradas	El número de paradas es un parámetro que sirve para medir la actividad vertical exploratoria del animal y su aumento indicaría un posible efecto estimulante ^(154, 155) .
Estereotipias	Los movimientos estereotipados son una medida de la actividad del animal durante los momentos en los que no se está desplazando, descenso ↓ está asociado a una sedación general y un aumento ↑ a un efecto estimulante ⁽¹⁵³⁾ .

Interpretación de las conductas medidas en la prueba actividad motriz. Elaborada con datos de Roth 1979, Todd 2009 y Prutt 2003.

6.7.8 Prueba de rota-rod

Para esta prueba se empleó un rodillo rotatorio que funciona con un motor eléctrico, que giró a 11 rpm. Debajo del aparato se colocó una caja de acrílico con aserrín que amortiguara las caídas de los animales. Las ratas se entrenaron para caminar sobre el rodillo 24 y 48 h antes de la prueba, por lapsos de 10 min con lo que se logró que el animal fuera capaz de mantenerse andando sin caer del rodillo. El día de la prueba se colocó al animal, se registró el número de caídas que tuvo el sujeto durante 5 min, regresándolo al cilindro cada vez que se cayera ⁽⁸⁸⁾. A continuación, en la tabla 15 se enlistan los materiales, instrumentos y reactivos mínimos requeridos para poder llevar a cabo las pruebas conductuales.

Tabla 15. Material de laboratorio, biológico, instrumentos y reactivos empleados por prueba

Actividad	Materiales
General	Bata, lentes de seguridad, guantes de nitrilo, guante antiderrapante, cubrebocas, bitácora del proyecto, calendario o protocolo resumido, ratas, bolígrafo, reloj de pulsera, cánulas intragástricas, émbolos de jeringa de 1 mL, papel toalla, aserrín.
Preparación de Soluciones	Frascos, etiqueta, papel, cinta adhesiva, plumín permanente, matraz aforado 10 mL, matraz aforado de 50 mL, balanza analítica, balanza granataria, pipeta graduada 10 mL, embolo de succión, desecador, extracto liofilizado, cloruro de sodio, agua destilada, papel glassine, tijeras, parafilm, espátula, sonicador (Elma® Mod. Transsonic digital S), papel aluminio, papel toalla, bitácora de reactivos, calculadora, parrilla de calentamiento y agitación, magneto recubierto de teflón, vaso de plástico con pico.
Pesado de animales	Balanza granataria con jaula, plumines permanentes, papel toalla, bitácora, jabón, fibra.
Tamizado farmacológico	Arena de acrílico de 50 cm de diámetro, papel plastificado, videocámara, tripié de la cámara de video, rejilla de acero, termómetro infrarrojo, caja de acrílico marcada en 9 áreas, contador manual, cronómetro.
Rota-Rod	Rota-Rod, caja con aserrín, bolsa de plástico negro chica, cronómetro, papel toalla.
Actividad locomotriz	Computadora, software de actímetro (p.ej.: SeDaCom), actímetro con puerto USB, monitor de actividad motora IR LE 881 IR, foco de vela (40 W), rollo de papel toalla, caja chica con aserrín, reloj de pulsera ó cronómetro, solución limpiadora (15 mL de etanol, 0.5 mL de amoniaco, 5 mL de isopropanol, 10 mL de Pinal®, 10 mL extran, aforado a 1000 mL con agua desionizada).
Nado Forzado	Cámara de video, cable de la cámara, base fijadora, mesa, tornillo para base de la cámara, desarmador, cilindros de vidrio PYREX® 20 cm diámetro interno x 45 cm altura interna, cronómetro, manguera, cubeta, colador, trapos, papel toalla, fibra suave, jabón, caja mediana con aserrín, foco de secado, termómetro de inmersión parcial de -20 °C a 100 °C, agua a una temperatura de 23-25 °C.
Enterramiento defensivo	Cámara de video, tripié de cámara, caja con electrodo, tapa enrejada, regulador de corriente, solución limpiadora, aserrín, cronómetro.
Laberinto elevado en cruz	Cámara de video, laberinto elevado en cruz, solución limpiadora, cronómetro, pinzas para bolos, bolsa chica de plástico para bolos.

6.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como media y error estándar (\pm E.E.M.). Los datos de cada parámetro fueron inicialmente analizados con una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos con una distribución normal fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para grupos independientes, y posteriormente con una prueba post-hoc de Holm-Sidak. Los datos que no siguieron la distribución normal fueron analizados con un ANOVA por rangos (Kruskal-Wallis) seguida por la prueba post-hoc de Dunn. En ambos casos las pruebas post-hoc fueron aplicadas únicamente cuando el análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) ⁽¹⁵⁶⁾. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa SigmaPlot, Versión 12.

Resultados

7.1 Efecto del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en un screening farmacológico

Comparados con el blanco (animales sin tratamiento) las ratas que recibieron el extracto (50, 100 y 1000 mg/kg) no mostraron diferencias en el desempeño en las pruebas de reja invertida y campo abierto. El tratamiento tampoco produjo cambios en la temperatura corporal. Sólo se observó diarrea moderada a la dosis de 1000 mg/kg. En el análisis detallado de los videos se registró que a partir de 50 mg/kg los animales mostraron señales de somnolencia con episodios breves de echado, que se presentaron con una latencia de 30 min a partir de la administración. Mientras que los animales tratados con 100 mg/kg mostraron señales de somnolencia con episodios prolongados de echado con una latencia de 15 min.

El análisis descriptivo permitió establecer la dosis de 50 mg/kg como la dosis máxima para experimentos de conducta, en los cuales se busca que el animal esté en vigilia y activo.

7.2 Efecto del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en la ansiedad y la depresión experimentales

7.2.1 Laberinto elevado en cruz

El análisis de varianza de una vía indicó que el tratamiento con *Calea zacatechichi* modificó significativamente todos los parámetros de ansiedad en el laberinto

elevado, excepto el número de entradas al brazo abierto. En la tabla 16 se describen los resultados de la prueba estadística.

Tabla 16. Resultados estadísticos de la prueba de LEC				
Conducta	Prueba de normalidad	ANOVA	Estadístico	Prueba post-hoc
Tiempo en brazo abierto	SW (-)	KW	H=12.543, g.l.=5, p=0.028	Dunnett
Tiempo en brazo cerrado	SW (+)	Una vía	F _{5,55} =5.520, p<0.001, g.l.=5	Holm-Sidak
Tiempo en centro	SW (+)	Una vía	F _{5,55} =4.166, p=0.003, g.l.=5	Holm-Sidak
Cruces	SW (+)	Una vía	F _{5,55} =4.283, p=0.002, g.l.=5	Holm-Sidak
Entradas a brazo abierto	SW (+)	Una vía	F _{5,55} =1.895, p=0.110	N/A
Entradas a brazo cerrado	SW (+)	Una vía	F _{5,55} =4.003, p=0.004, g.l.=5	Holm-Sidak
Inmersiones de cabeza	SW (+)	Una vía	H=19.599, g.l.=5, p=0.002	Dunnett

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, SW: "+" significa que los datos siguen una distribución normal; (-) significa que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto el análisis de esos datos se hizo con una prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis, KW. La prueba pos hoc no fue incluida en los grupos de datos que no alcanzaron la significancia estadística con el análisis de varianza (N/A, no aplica).

En las figuras 12 y 13 se muestra el efecto del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en el laberinto elevado en cruz. El tratamiento con el extracto incrementó el porcentaje de tiempo que las ratas permanecieron en el brazo abierto, lo cual alcanzó significancia a partir de la dosis de 25 mg/kg (figura 13a), sin cambios en cuanto a la magnitud del efecto con la dosis de 50 mg/kg. A partir de la dosis de 6.25 mg/kg el extracto disminuyó significativamente el tiempo que las ratas permanecieron en el brazo cerrado (figura 13b), y aumentó el tiempo en el centro del laberinto (figura 13c). En ambos casos el efecto máximo se produjo con la dosis de 50 mg/kg. El tratamiento aumentó el número de cruces totales en el laberinto (figura 13d) y el número de entradas al brazo cerrado (figura 14b), sin modificar significativamente las entradas al brazo abierto (figura 14a). Los efectos máximos se encontraron con la dosis de 12.5 mg/kg. Finalmente, el tratamiento

con el extracto facilitó de forma significativa el número de inmersiones de cabeza, cuando la rata se coloca en una de las orillas del brazo abierto. Este efecto se produjo desde 12.5 mg/kg y se mantuvo hasta los 50 mg/kg.

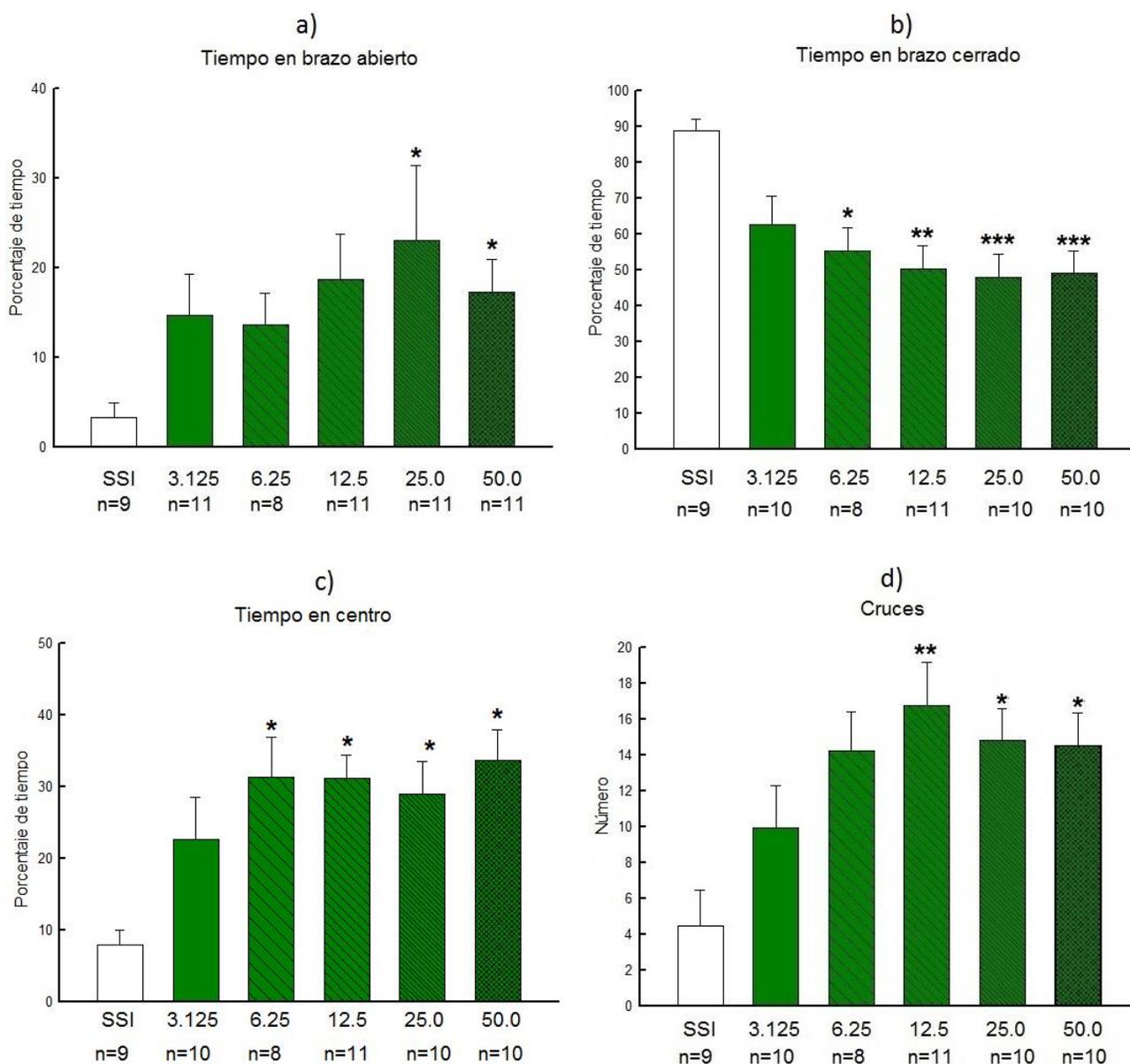


Figura 13. Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en LEC. Se muestran los resultados del tiempo que pasan las ratas en los brazos abiertos (a), brazos cerrados (b) o en el centro del laberinto (c), así como el número de cruces (d). Los datos están expresados en media \pm E.E.M (error estándar de la media). Resultados de la prueba pos hoc * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs el grupo control vehículo.

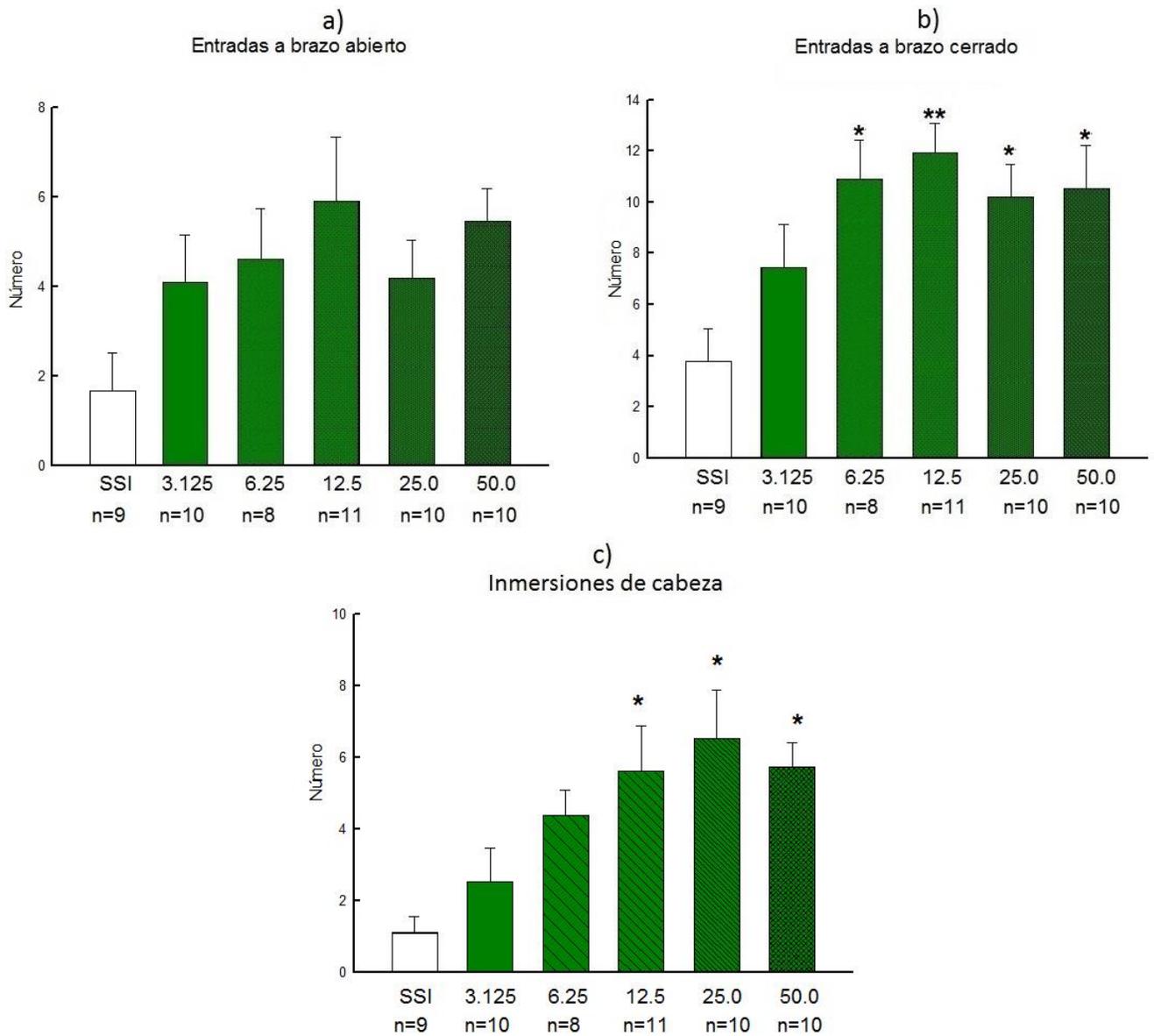


Figura 14. Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en LEC. Se muestran los resultados del el número de entradas que hicieron las ratas a los brazos abiertos (a), a los brazos cerrados (b) y el número de inmersiones e cabeza (c). Los datos están expresados en media \pm E.E.M. Resultados de la prueba pos hoc * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs el grupo control vehículo.

7.2.2 Enterramiento defensivo

El tratamiento produjo algunas variaciones en las conductas evaluadas en esta prueba (figura 15), sin embargo, el análisis de varianza indica que el extracto no modificó significativamente ningún parámetro en la prueba de enterramiento defensivo (tabla 17).

Tabla 17. Resultados estadísticos de la prueba de ED				
Conducta	Prueba de normalidad	ANOVA	Estadístico	Prueba post-hoc
Tiempo de enterramiento total	SW (-)	KW	H=9.796, g.l.=5, p=0.081	N/A
Latencia de enterramiento	SW (-)	KW	H=14.349, g.l.=5, p=0.014	N/A
Numero de choques	SW (+)	Una vía	$F_{5,47}=0.834$, p=0.532, g.l.=5	N/A
Acercamientos al electrodo	SW (-)	KW	H=2.373, g.l.=5, p=0.795	N/A

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, SW: “+” significa que los datos siguen una distribución normal; (-) significa que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto el análisis de esos datos se hizo con una prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis, KW. La prueba pos hoc no fue incluida en los grupos de datos que no alcanzaron la significancia estadística con el análisis de varianza (N/A, no aplica).

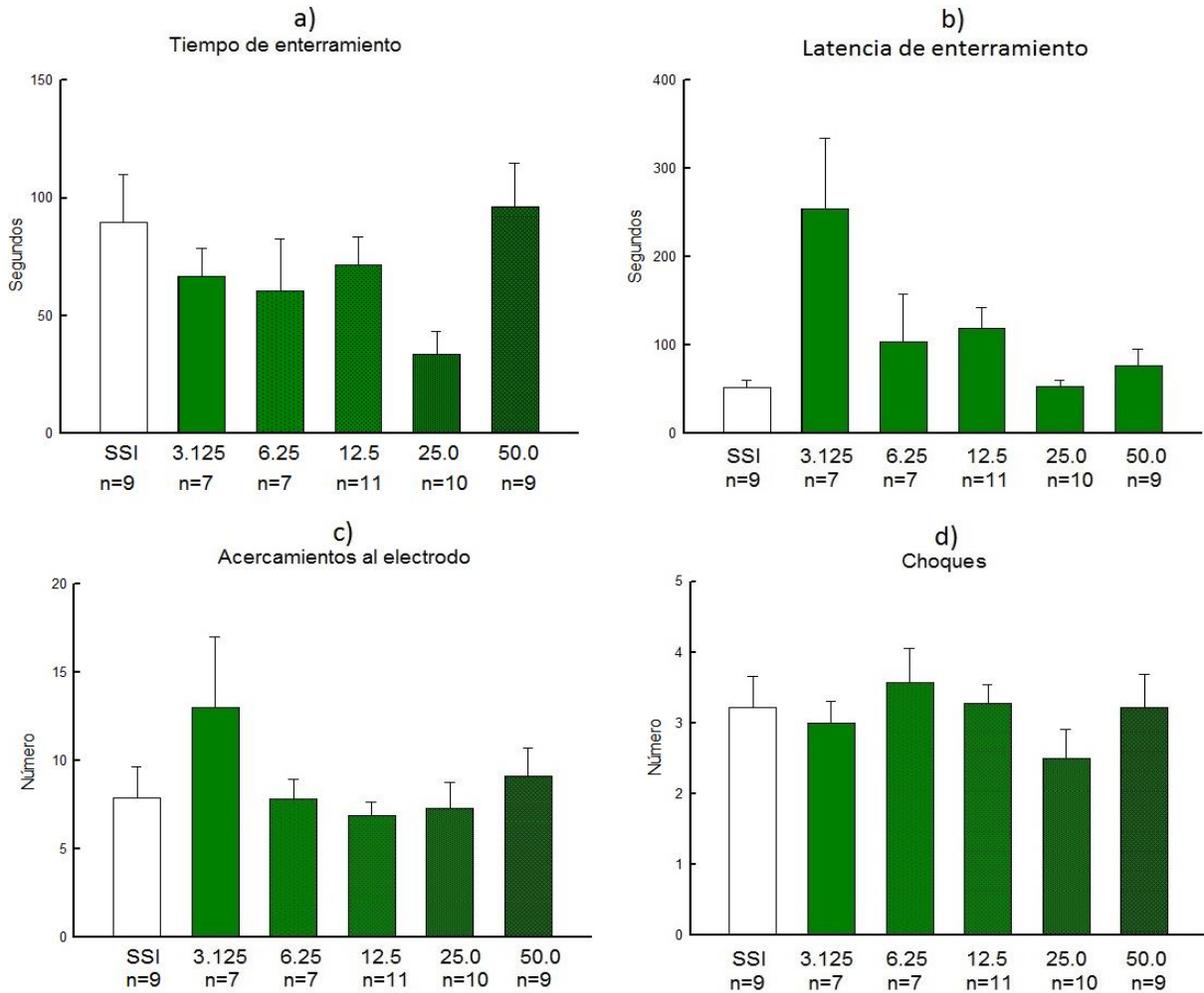


Figura 15. Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en ED. Se muestran los resultados del tiempo que pasan las ratas enterrando el electrodo (a), la latencia de enterramiento (b), el número de veces que se acercó al electrodo (c), y el número de choques que recibió (d). Los datos están expresados en media \pm E.E.M.

7.2.3 Nado forzado

El análisis de varianza (tabla 18) de una vía indicó que el tratamiento con el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* modificó significativamente tanto la inmovilidad como el escalamiento, pero sin modificar la conducta de nado.

Tabla 18. Resultados estadísticos de la PNF				
Conducta	NORM	ANOVA	Estadístico	Prueba post-hoc
Inmovilidad	SW (+)	Una vía	H=11.317, g.l.=5, p=0.045	Dunnett
Escalamiento	SW (+)	Una vía	F _{5,45} =3.076, p=0.018, g.l.=5	Holm-Sidak
Nado	SW (-)	KW	H=1.844, g.l.=5, p=0.865	N/A

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, SW: “+” significa que los datos siguen una distribución normal; (-) significa que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto el análisis de esos datos se hizo con una prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis, KW. La prueba pos hoc no fue incluida en los grupos de datos que no alcanzaron la significancia estadística con el análisis de varianza (N/A, no aplica).

El tratamiento con el extracto disminuyó de manera significativa la inmovilidad a partir de la dosis de 25 mg/kg (figura 16a), sin cambios en cuanto a la magnitud del efecto con la dosis más alta utilizada. En el escalamiento, el extracto produjo un único incremento significativo a la dosis de 25 mg/kg (figura 16b).

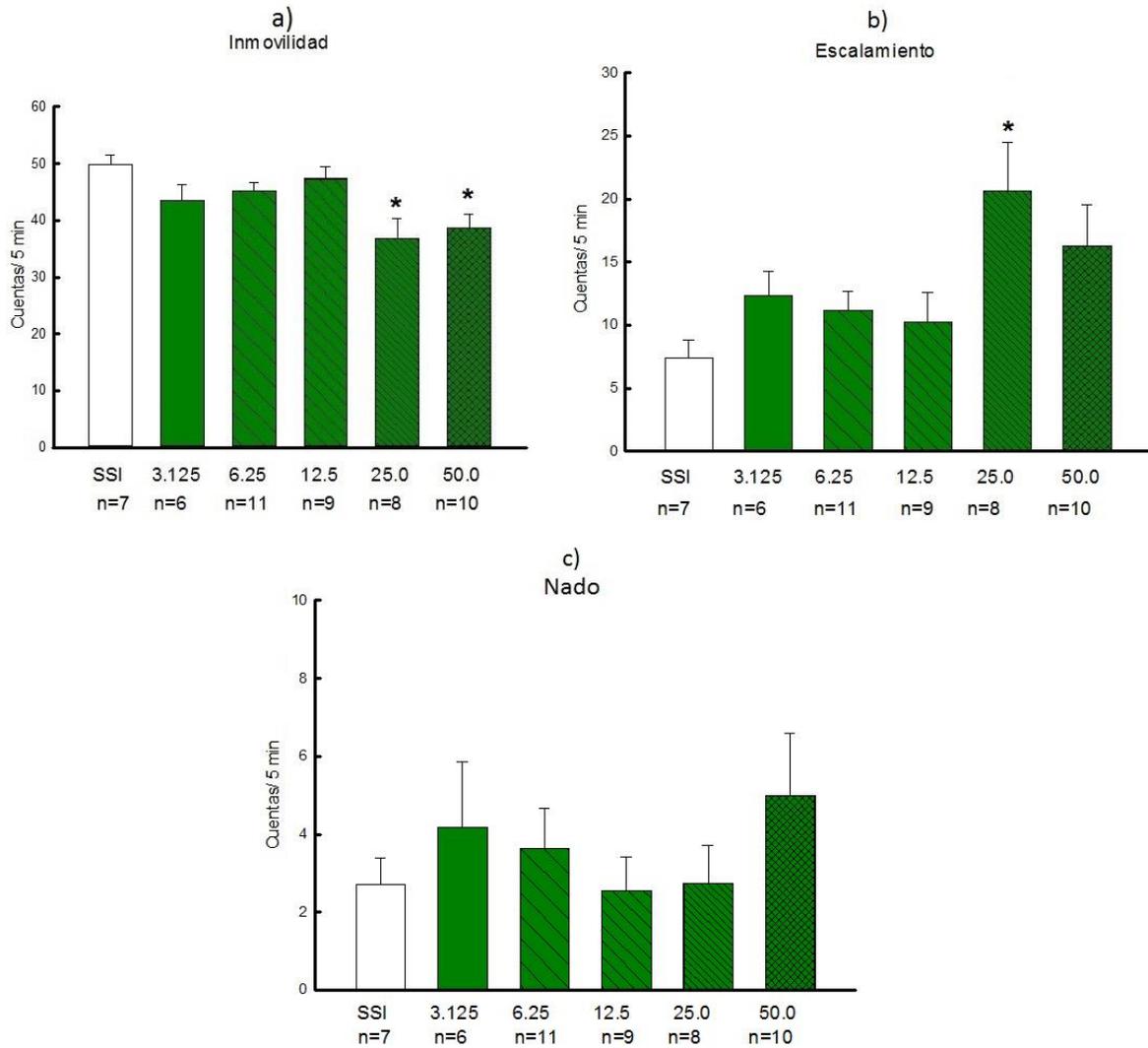


Figura 16. Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en PNF. Se muestran los resultados del tiempo que pasan las ratas en inmovilidad (a), escalamiento (b) o en nado (c). Los datos están expresados en media \pm E.E.M. Resultados de la prueba pos hoc * $p < 0.05$, vs el grupo control vehículo.

7.3 Efecto del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en la actividad motriz

7.3.1 Campo abierto

En la prueba de campo abierto, (tabla 19) el tratamiento no modificó de forma estadísticamente significativa ninguno de los parámetros registrados en la prueba de actividad locomotriz (ver figura 17).

Tabla 19. Resultados estadísticos de la prueba de CA				
Conducta	NORM	ANOVA	Estadístico	Prueba post-hoc
Ambulación	SW (+)	Una vía	$F_{5,62}=0.880$, $p=0.5$, g.l.=5	N/A
Estereotipias	SW (+)	Una vía	$F_{5,43}=1.136$, $p=0.351$, g.l.=5	N/A
Paradas	SW (-)	KW	$H=2.814$, g.l.=5, $p=0.729$	N/A

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, SW: "+" significa que los datos siguen una distribución normal; (-) significa que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto el análisis de esos datos se hizo con una prueba no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis, KW. La prueba pos hoc no fue incluida en los grupos de datos que no alcanzaron la significancia estadística con el análisis de varianza (N/A, no aplica).

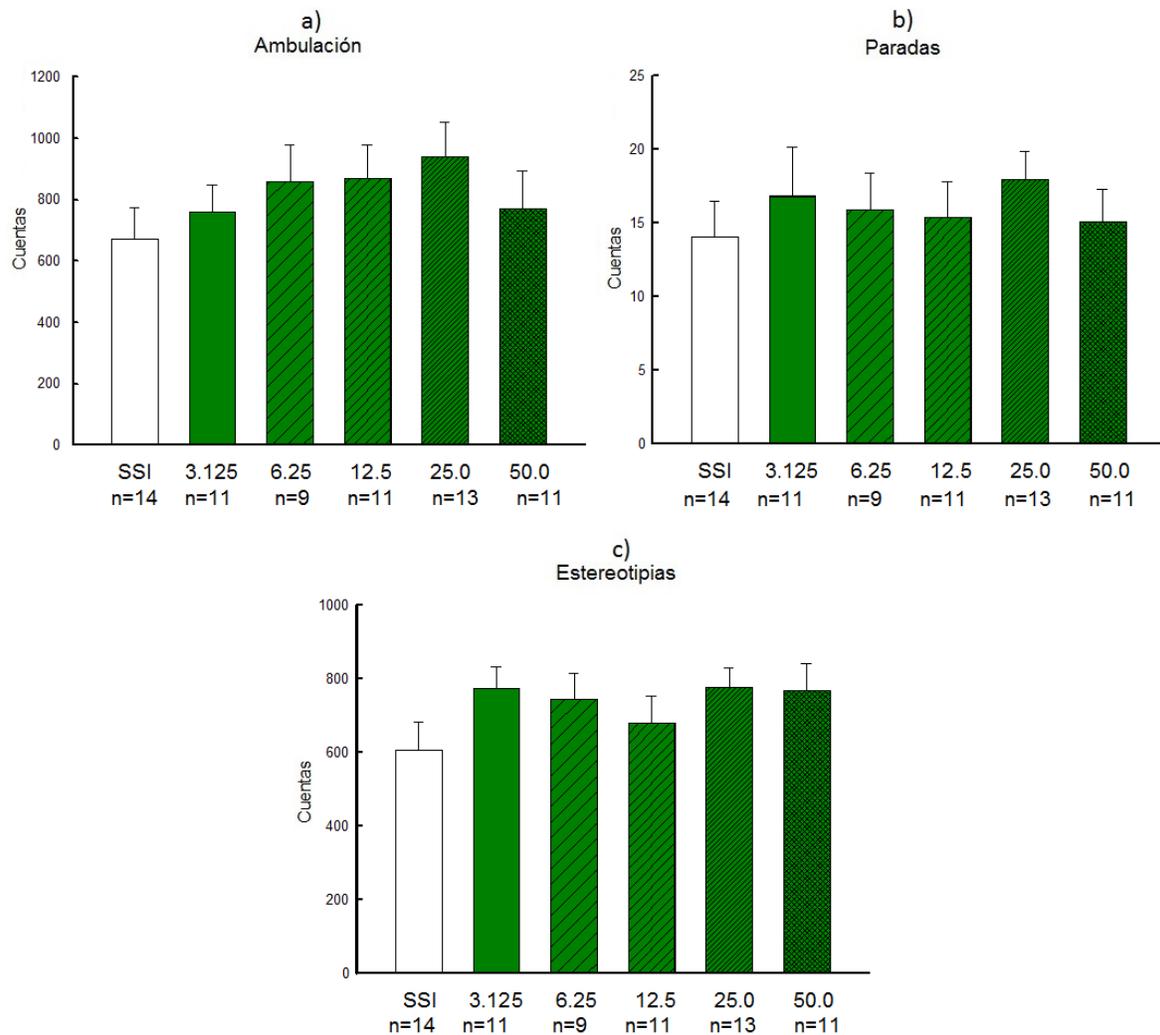


Figura 17. Curvas dosis-respuesta del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en la prueba de CA. Se muestran los resultados del tiempo que pasan las ratas en actividad ambulatoria (a), el número de veces que se pararon (b) y el número total de estereotipias (c). Los datos están expresados en media \pm E.E.M.

7.3.2 Prueba de Rota-rod

En esta prueba encontramos que *Calea zacatechichi* administrado de forma subcrónica no provocó que las ratas se cayeran del rollo giratorio (ver tabla 20).

Tabla 20. Resultados obtenidos en la prueba de coordinación locomotriz

Tratamiento	Caídas*
Vehículo	0
3.125 mg/kg	0
6.25 mg/kg	0
12.5 mg/kg	0
25 mg/kg	0
50 mg/kg	0

*Expresado como la mediana

En la Tabla 21 se muestra un resumen de los efectos del extracto en los parámetros de cada prueba conductual.

Tabla 21. Resumen de resultados

Sustancia	Laberinto elevado en cruz							Enterramiento defensivo				Nado forzado		
	TBA	TBC	TC	CRS	EBA	EBC	IC	ENT	LAT	AE	CHO	INM	NAD	ESC
S.S.I.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3.125 mg/kg	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6.25 mg/kg	--	↓	↑	--	--	↑	--	--	--	--	--	--	--	--
12.5 mg/kg	--	↓	↑	↑	--	↑	↑	--	--	--	--	--	--	--
25.0 mg/kg	↑	↓	↑	↑	--	↑	↑	--	--	--	--	↓	--	↑
50.0 mg/kg	↑	↓	↑	↑	--	↑	↑	--	--	--	--	↓	--	--

“↑” significa que la dosis empleada de extracto aumentó de manera significativa el parámetro respecto al vehículo; “↓”significa que la dosis empleada de extracto disminuyó de manera significativa el parámetro respecto al vehículo; “--” indica que no hubo diferencias en los efectos comparado con el vehículo.

Discusión

8.1 El extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce efecto ansiolítico en modelos animales.

Estudios previos en humanos han demostrado que los extractos orgánicos de *Calea zacatechichi* producen efectos depresores del SNC, que son más potentes cuando el extracto tiene una base acuosa ⁽³⁾. *Calea zacatechichi* parecía inducir efectos tranquilizantes ya que cuando es ingerida en la noche antes de dormir produce un “sueño nocturno particularmente tranquilo” y “sensación de bienestar” durante la vigilia ^(14, 23). En el presente estudio se evaluó la actividad ansiolítica del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* en ratas macho Wistar adultas en dos pruebas de ansiedad ampliamente usadas en la investigación preclínica, el LEC y el modelo de ED.

En el LEC, el extracto a partir de la dosis de 25 mg/kg fue capaz de aumentar el tiempo en brazo abierto, que es la principal medida empleada para detectar el efecto ansiolítico de fármacos en este modelo ^(95, 101), así como el número de inmersiones de cabeza, otra medida relacionada directamente al efecto ansiolítico, que el extracto logró aumentar a partir de la dosis 12.5 mg/kg. De manera congruente con los cambios en el tiempo en brazos abiertos, *Calea zacatechichi* también redujo el tiempo de permanencia en los brazos cerrados desde la dosis de 6.25 mg/kg, lo cual es una medida indirecta del efecto ansiolítico ⁽⁹⁵⁾. En las medidas de exploración se encontró que *Calea zacatechichi* facilitó el número de entradas al brazo cerrado (6.25 mg/kg) y el número de cruces totales en el laberinto (12.5 mg/kg). Los resultados en conjunto sugieren que el extracto acuoso

de *Calea zacatechichi* produce efectos de tipo ansiolítico. Los cambios en las medidas de exploración podrían sugerir efectos estimulantes, sin embargo, se sabe que fármacos con estas propiedades, como la cafeína, el pentilentetrazol y la anfetamina ⁽⁹⁵⁾, no aumentan el tiempo de permanencia en el brazo abierto. Asimismo, los animales tratados con las dosis más altas del extracto, no mostraron incremento en la ambulación total, en el número de paradas o en el número de estereotipias en la prueba de campo abierto. Lo que permite sugerir que el extracto produjo efectos ansiolíticos específicos en el LEC.

El incremento en el tiempo de permanencia en brazo abierto en LEC, logra la significancia a partir la dosis 25 mg/kg, sin embargo, el número de inmersiones de cabeza alcanza significancia desde la dosis 12.5 mg/kg. Esto podría indicar que el efecto ansiolítico inicia débilmente en 12.5 mg/kg y se consolida a partir de 25 mg/kg dosis. En esta misma prueba, el tratamiento comienza a tener otros efectos significativos desde la dosis 6.25 mg/kg, ya que aumenta el tiempo que pasan las ratas en el centro del LEC, sin embargo, esta medida está validada únicamente como referencia de la conducta exploratoria del animal, por ello la dosis inicial para lograr un efecto tipo ansiolítico en ratas es la de 12.5 mg/kg.

El efecto tipo ansiolítico del extracto alcanza su máximo efecto en la dosis 25 mg/kg y comienza a decrecer en la dosis 50 mg/kg, esto se aprecia tanto en el tiempo en brazo abierto como en el número de inmersiones de cabeza. Esto sugiere la presencia de una curva en forma de U invertida de efectos ansiolíticos, como la presentan extractos ricos en compuestos flavónicos en LEC ⁽¹⁵⁷⁾.

En la prueba de enterramiento defensivo, la administración del extracto no produjo efectos farmacológicamente relevantes en las medidas que reflejan ansiedad o reducción del temor, por ejemplo, el tiempo total de enterramiento o los acercamientos al electrodo. Sin embargo, los resultados negativos tanto en la latencia de enterramiento como en la prueba de actividad motriz permiten descartar que la falta de efecto ansiolítico en este modelo se asocie a efectos sedantes, ya que las ratas bajo tratamiento no mostraron incremento de la latencia para enterrar el electrodo, una conducta relacionada a la reactividad del animal ante el evento adverso, ni reducción de la actividad ambulatoria, el número de paradas o las estereotipias. Tampoco hubo un incremento significativo en el número de choques recibidos, lo que sugiere que el extracto no daña la memoria ni modifica el umbral de nocicepción. Aunque este modelo no resultó sensible a los efectos ansiolíticos del extracto, algunos resultados sugieren que éste no afecta de manera inespecífica la atención, la nocicepción o la reactividad al estímulo eléctrico.

8.1.1 Diferencias entre modelos

De acuerdo con los resultados el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* fue activo sólo en el modelo de LEC. Esta diferencia en los efectos puede interpretarse desde la perspectiva que cada prueba modela distintos aspectos de la ansiedad. Mientras que el LEC está propuesto como un modelo de miedo a los espacios abiertos (agorafobia/acrofobia), la prueba de ED ha sido a su vez propuesta como un modelo de ansiedad generalizada provocada por un estímulo nocivo (fobia

específica). En el LEC la ansiedad se ve expresada en las conductas que son: la evitación de los espacios abiertos, la evitación de las alturas y una preferencia por los espacios cerrados, esta es una forma de miedo natural, que hace que el animal manifieste un mecanismo de defensa pasivo, que es la evitación de los brazos abiertos ⁽¹⁵⁸⁾. En la prueba de ED se provoca un miedo condicionado a un estímulo aversivo específico, que puede generar un mecanismo de defensa de tipo activo que es la conducta de enterramiento ^(72, 159).

Cada especie animal posee un repertorio de conductas que le permite sobrevivir en su ambiente natural, los animales poseen tipos de 2 estrategias de defensa, pelear o huir. Una de las respuestas de lucha de las ratas hacia una amenaza incluye la acción de enterrar el estímulo aversivo de peligro con el fin de que ya no represente un riesgo ⁽⁹²⁾. Por otro lado, las ratas tienen un miedo incondicionado a los espacios abiertos, y huyen pasivamente de ellos, con reducción de la exploración ⁽⁸⁶⁾. Por lo que una explicación alternativa, pero que no excluye a la anterior, es que el tratamiento afecta formas de ansiedad que tienen que ver con la exploración de ambientes nuevos.

En conjunto los resultados sugieren que el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* a partir de la dosis de 25 mg/kg es capaz de provocar un efecto tipo ansiolítico en formas no condicionadas de la ansiedad, que se expresan como una mayor exploración de ambientes adversos.

8.2. El extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce efecto de tipo antidepresivo en la PNF

Estudios previos sugieren que *Calea zacatechichi* podría inducir un efecto antidepresivo ya que sus efectos son percibidos como una “sensación de bienestar” ⁽²³⁾. Asimismo, en los tiempos prehispánicos posiblemente ya se empleaba como remedio para trastornos afectivos porque su uso se reporta como tal: “la infusión es auxiliar para las emociones” ⁽³⁸⁾. Para conocer el posible efecto antidepresivo del extracto se utilizó la prueba de nado forzado ⁽⁹⁴⁾, que es un modelo sensible a fármacos antidepresivos de varios tipos, que tiene una alta validez de predicibilidad. Los resultados actuales indican que el extracto acuoso podría tener potencial como antidepresivo, ya que a las dosis de 25-50 mg/kg, notablemente disminuyó la conducta de inmovilidad. Este efecto no se relacionó con posibles acciones estimulantes en la prueba de actividad motriz, por lo que es posible sugerir la actividad específica del extracto sobre la conducta tipo depresiva. Asimismo, ya que el extracto no aumenta el número de choques en la prueba de ED, podemos sugerir que éste no daña la memoria, esto es importante ya que en la PNF se necesita que el animal adquiera la indefensión aprendida en la sesión de pre-prueba (primera inmersión, de 15 min de duración).

La PNF es una herramienta de gran utilidad para el farmacólogo, ya que es capaz de distinguir entre antidepresivos que poseen un mecanismo de acción serotoninérgico de uno catecolaminérgico. El extracto utilizado en la presente tesis, a las dosis que redujeron la conducta de inmovilidad, aumentó la conducta de

escalamiento, sin modificar de forma significativa la conducta de nado. Tales resultados invitan a pensar que el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce efectos de tipo antidepresivo por un mecanismo que podría involucrar a las catecolaminas. Con los resultados actuales no podemos hacer una distinción entre los efectos de tipo noradrenérgico, de aquellos de tipo dopaminérgico. Únicamente podemos afirmar que, como se ilustra en la tabla 10, el extracto muestra un perfil comparable al de los principios activos noradrenérgicos como la desipramina, la maprotriptilina, y la reboxetina. El mecanismo preciso debe ser elucidado en un estudio diseñado para tal propósito.

Estudios previos ⁽¹⁶⁰⁾ revelan que la sesión de pre-prueba en nado forzado provoca algunos componentes de ansiedad, que podrían ser determinantes para la expresión de la conducta de inmovilidad (conducta tipo depresiva). Los resultados del presente trabajo sugieren que el tratamiento produce acciones duales (sobre la ansiedad y la depresión) y que no es posible descartar la influencia de la actividad ansiolítica del extracto sobre la prueba de depresión.

8.3. Posibles efectos tóxicos de *Calea zacatechichi*

En estudios previos se demostró que *Calea zacatechichi* es un depresor del SNC, pero no posee efectos tipo alucinógenos ni disociativos, y aunque se han reportado que produce: mareos, alarga el tiempo de reacción y la estimación de tiempo en humanos, estos efectos parecen estar más asociados al efecto “inductor del sueño” más que a un efecto sedante ^(3, 24). En este estudio se realizaron pruebas en las que se miden conductas que están relacionadas a efectos tóxicos

conocidos de fármacos ansiolíticos y antidepresivos como son: ataxia, amnesia y sedación. La sedación es un efecto secundario de fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas y antidepresivos tricíclicos, entre otros fármacos ⁽⁶³⁾.

Es posible detectar este efecto en animales en la prueba de AL como una disminución en el número de paradas, en LEC como una disminución en el número de cruces y en ED con un aumento en el número de choques ^(92, 95, 154, 155).

La prueba de rota-rod es empleada para detectar fármacos que dificultan la coordinación motriz, es sensible a los efectos atáxicos del alcohol, de las benzodiazepinas y a fármacos antidepresivos que producen este efecto indeseable que es observable en la aparición de caídas del cilindro giratorio ⁽¹⁶¹⁾, el tratamiento no produjo alteraciones en ninguna de estas medidas evaluadas en las pruebas.

Un aumento significativo en el número de choques esta también asociado a efectos analgésicos, ya que la analgesia dificultaría la capacidad del animal de percibir la pequeña descarga que recibe del electrodo. Este dato contrasta con las propiedades analgésicas del acacetin, un compuesto flavonico presente en una gran variedad de plantas con actividad biológica ⁽¹⁶²⁾. Acacetin y sus derivados fue hallado previamente en las partes aéreas de la planta, sin embargo, parece ser que a las dosis utilizadas (y poca abundancia en el extracto) no es capaz producir efectos sobre la percepción dolorosa. El aumento en el número de choques también está asociado a fármacos con conocidos efectos amnésicos, por ejemplo, disolventes industriales como el tolueno que provocan un aumento de hasta 20

choques en ED ⁽¹⁶³⁾. Un daño en las áreas relacionadas a la memoria dificultaría la capacidad del animal de evitar el contacto con el electrodo, sin embargo, el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* no aumentó el número de choques. El resultado contrasta con los estudios previos que reportan que *Calea zacatechichi* provoca dificultad para recordar ^(3, 23). Esto podría deberse a que los voluntarios en ese estudio estaban experimentando los efectos de una dosis muy alta, o a que al ser inhalada se hayan administrado compuestos que no estén presentes en la fase acuosa ⁽²³⁾ por lo que en las dosis aquí empleadas es posible que no se presente este efecto tóxico (la máxima dosis 50 mg/kg equivale apenas a 13 g de material seco). Una explicación alternativa es que la rata es un animal que posee un metabolismo más rápido que el de los humanos; es posible que debido a esto no sea detectado este efecto en las pruebas conductuales. Es necesario estudios específicos, posiblemente con administración repetida, que permitan medir los efectos de *Calea zacatechichi* en la atención y la memoria.

8.4 Posibles componentes responsables de los efectos hallados

Estudios previos de su fitoquímica han hallado en sus partes aéreas sesquiterpenlactonas, flavonoides, alqueninos y esteroides de los cuales solamente las sesquiterpenlactonas y los compuestos flavónicos han demostrado poseer actividad en el SNC ^(40, 41, 164).

Las sesquiterpenlactonas son un grupo de compuestos que han demostrado poseer efectos tipo antidepresivos y tipo ansiolíticos en estudios recientes donde aumentan el tiempo en brazos abiertos en LEC y disminuyen la inmovilidad en la

PNF ^(41, 165). Se ha propuesto que algunas sesquiterpenlactonas, como podoandina (aislada de *Hedyosmum brasiliense*) interaccionan con los sistemas de 5-HT y NA para producir efectos antidepresivos, ya que las acciones en la PNF fueron bloqueadas por antagonistas serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1A/1B} y 5-HT₃, y antagonistas de los adrenoceptores α -1 y α -2 ⁽⁴¹⁾. Asimismo, no se mostró participación del sistema gabaérgico en tales efectos.

Calea zacatechichi es especialmente rica en variedad y concentración de este tipo de sustancias, de ella se han aislado de las partes aéreas al menos 13 moléculas distintas de este tipo, entre las que se han hallado principalmente: Acetilerioflorina, budleínas, caleinas, zacatechinólidos y zexbrevina (anexo 2). Hay que mencionar que, aunque para su aislamiento y análisis se emplea comúnmente una extracción inicial con disolventes no polares, estos compuestos se hallan también presentes en las fracciones polares ⁽¹⁶⁶⁾, por lo que estos compuestos podrían tener una participación en los efectos ansiolítico y antidepresivo demostrado en este estudio, sumados a los conocidos efectos ansiolíticos de la fracción flavónica.

Los compuestos flavónicos que se han aislado de las partes aéreas de la planta son 3: acacetin, 7-O-metil acacetin, caleocromeno A y 4,7-dimetil éter apigenina ^(167, 168, 169, 170). En *Calea zacatechichi* se hallan en mayor concentración estas moléculas, recientemente se ha hallado que derivados del acacetin son capaces de aumentar el tiempo en brazos abiertos en LEC en ratones ⁽¹⁷¹⁾ lo que sugiere que estos compuestos podrían ser los principales responsables del efecto tipo ansiolítico del extracto. Recientemente se halló también que la apigenina es capaz

de producir efectos tipo ansiolíticos ⁽¹⁵⁷⁾, por lo que es posible que el derivado presente en la planta también sea responsable en parte de este efecto. Los resultados del presente estudio podrían sugerir que *Calea zacatechichi* tiene cierto parecido a los efectos de las benzodiazepinas en el LEC, sin embargo no reduce el número de cruces en laberinto ni las entradas al brazo abierto, tampoco afectó la conducta en ED ni en AL, por lo que se descarta que el extracto actúe por vías gabaérgicas. Por otro lado, los resultados en la prueba de nado no sugieren interacción con el sistema de la 5-HT. Sin embargo, este estudio es descriptivo y se requiere más investigación para conocer las interacciones de *Calea zacatechichi* con los diferentes sistemas de neurotransmisión que regulan las conductas depresivas y/o ansiosas en roedores.

8.4.1 Efectos de *Calea zacatechichi* en la ansiedad y la depresión

Calea zacatechichi es una planta de la que existen pocos estudios acerca de su actividad biológica. Se ha encontrado que sus extractos poseen varias actividades farmacológicas entre las que se encuentran: Antiinflamatoria ⁽³⁵⁾, antileishmánica ⁽³³⁾, antiplasmódica ⁽³⁴⁾, hipoglucemiante ⁽³⁷⁾ e inductor del sueño ⁽³⁰⁾. En este estudio se aportó evidencia de que el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* posee potencial farmacológico como antidepresivo y ansiolítico. Los efectos en la ansiedad se comenzaron a presentar a dosis bajas, mientras que el efecto antidepresivo se produjo a partir de 25 mg/kg. La principal ventaja de este extracto acuoso es que podría emplearse como tratamiento para trastornos depresivos comórbidos con ansiedad, sin producir la característica sedación de los fármacos alopáticos.

El margen de seguridad que demostró poseer *Calea zacatechichi* en este estudio se encuentra en un rango de dosis que abarca hasta 50 mg/kg. Dosis en las cuales se inician y mantienen los efectos terapéuticos sin alterar la motricidad o la memoria de las ratas. En estudios en humanos usando dosis más altas (60 g/kg de planta seca) se comienzan a apreciar efectos sobre la memoria y la velocidad de reacción, así como efectos sobre el sueño ^(3, 23). Estudios recientes del grupo de colaboración de investigación de *Calea zacatechichi* sugieren que dosis cercanas a 100 mg/kg inducen el sueño y cambios en la macroarquitectura del sueño en ratas ⁽¹⁷²⁾.

8.5 Perspectivas y limitaciones

El material vegetal empleado en este estudio fue proporcionado por un proveedor comercial, y es posible que su composición fitoquímica sea distinta de la que se ofrece comercialmente en otros establecimientos. Es importante tener en cuenta que puede haber una gran variabilidad de la composición química de acuerdo a la época de recolección y su situación geográfica, entre otros factores ⁽³⁾.

De las posibles líneas de investigación a seguir, la más importante podría ser la identificación de las sesquiterpenlactonas que posean la mayor actividad antidepressiva y/o ansiolítica. Con base en los estudios en humanos, también es importante evaluar los efectos del extracto o compuestos puros sobre la memoria y atención, para identificar la dosis umbral para efectos secundarios.

Este estudio se llevó a cabo en un esquema de tratamiento subcrónico. Sin embargo, sería interesante evaluar el efecto del extracto o de las moléculas activas en un tratamiento de crónico.

Otros usos tradicionales de *Calea zacatechichi* no han sido estudiados de manera formal, un ejemplo es que esta planta es empleada para “causar aversión al tabaco” ⁽²³⁾, esto sugiere la presencia de compuestos con actividad anti-adictiva que podrían explorarse en un modelo en rata de auto-administración de nicotina.

Conclusiones

1. La administración sub-crónica del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce un efecto ansiolítico a las dosis de 25 mg/kg y de 50 mg/kg en la prueba de LEC pero no en la prueba de ED.
2. La administración sub-crónica del extracto acuoso de *Calea zacatechichi* produce un efecto tipo antidepresivo a las dosis de 25 mg/kg y de 50 mg/kg, que podría involucrar una interacción de sus componentes con el sistema de las catecolaminas.
3. El extracto acuoso de *Calea zacatechichi* no altera la coordinación motriz, la memoria, y no produce sedación o abatimiento locomotor.

REFERENCIAS

1. Bringas GAT, Macedo MAS, Cancio JAR, Téllez MBR. Acceptance and use of therapeutic medical plants in family medical care. *Sal Pub Mex.* 1999; 41:216–220.
2. Castro AJA, Miranda JJM, Martínez AZ, Salcedo MRJ, Galicia CF, Zúñiga LAF, et al. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *J of Ethnoph.* 2012; 143(1):292-298.
3. Mayagoitia NL. Análisis neurofarmacológico de un onirógeno vegetal *Calea zacatechichi* [Tesis de licenciatura]. México: UNAM, Facultad de Química; 1981.
4. Cotton CM. *Ethnobotany: Principles and applications.* Chichester, Inglaterra: Wiley; 1996.
5. American Psychiatric Association. *DSM-IV manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.* 4th Ed. Londres: American Psychiatric Publishing; 1995.
6. Schultes RE, Hofmann A. *Plantas de los dioses: Orígenes del uso de alucinógenos.* Nueva York, EUA: McGraw-Hill; 1979.
7. Kurland AA, Grof S, Pahnke WN, Goodman LE. Psychedelic drug assisted psychotherapy in patients with terminal cancer. En: Goldberger IK, Malitz S, Kutscher AH. *Psychotherapy pharmacological agents for the terminally ill and bereaved.* New York, EUA: Columbia University Press; 1973.
8. Strassman RJ. Hallucinogenic drugs in psychiatric research and treatment, perspectives and prospects. *J of Nerv and Ment Dis.* 1995; 183:127-138.

9. Mangini M. Treatment of alcoholism using psychedelic drugs: A review of the program of research. *J of Psych Drugs*. 1998; 30:381-418.
10. Moreno FA, Wiegand CB, Taitano EK, Delgado PL. Safety, tolerability and efficacy of psilocybin in 9 patients with obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psych*. 2006; 67:1735-1740.
11. Sewell RA, Halpen JH, Pope HG. Response of cluster headache to psilocybin and LSD. *Neur*. 2006; 66(12):1920-1922.
12. Berenzon S, Lara MA, Robles R, Medina-Mora ME. Depresión: estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México. *Sal Pub Mex*. 2013; 55(1):74-80.
13. Medina MME, Borges G, Lara C, Benjet C, Blanco J, Fleiz C, et al. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México. *Sal Ment*. 2003; 26(4):1-16.
14. Díaz JL. Etnofarmacología de algunos psicotrópicos vegetales en México. En: Díaz JL. Etnofarmacología de plantas alucinógenas latinoamericanas. Cuadernos científicos CEMEF, vol. 4. México: Centro Mexicano de Estudios en Farmacodependencia; 1975.
15. Heywood VH, Harbourne JB, Turner BL. An overture to the *Compositae*. En: Heywood VH, Harbourne JB, Turner BL. The biology and chemistry of the *Compositae*. USA: Academic Press; 1977.
16. Martínez M. Plantas medicinales de México. D.F., México: Botas; 1939.

17. IUCN International union for conservation of nature [Internet]. Switzerland: IUCN conservation centre; [Citado el 28 Sep 2014] Disponible en: goo.gl/moKhPQ.
18. Weber Seeds [Internet]. The Netherlands: Anónimo; c2009 [citado 01 Dic 2013]. *Calea zacatechichi*, Dream herb. Disponible en: <http://goo.gl/6Hdm9z>.
19. Schlechtendal DFL. *De Plantis Mexicanis*. Linnaea. 1834; 9:589–590.
20. GBIF. *Calea zacatechichi* Schdl [Internet]. Global biodiversity information facility. [Citado el 01 Feb 2014] Disponible en: goo.gl/QHXPcU.
21. EOL. *Calea zacatechichi* [Internet]. Encyclopedia of life. [Citado el 01 Feb 2014] Disponible en: goo.gl/7bcPH6.
22. Nath N. *Calea zacatechichi* [Internet]. Folia. [Citado el 01 Feb 2014] Disponible en: goo.gl/wD1X70.
23. Díaz JL. Ethnopharmacology and taxonomy of Mexican psychodysleptic plants. *J of Psych D*. 1979; 11(1-2): 71-101.
24. Giral L, Labadaum S. Principio amargo del zacatechichi. *Ciencia*. 1959; 19:243.
25. Baytelman B. *Etnobotánica en el estado de Morelos*. México: INAH; 1979.
26. Pichini S. *Smart drugs*. Roma, Italia: Osservatorio fumo, alcohol e droga; 2010.
27. Mac Dougall, T. *Calea zacatechichi: A compositae with psychic properties?* *Garden Journal*. 1968; 18:105.
28. Ott J. *Pharmacoteon: Drogas enteogénicas, sus fuentes vegetales y su historia*. Barcelona, España: La liebre de marzo; 1993.

29. Schultes RE, Hofmann A, Rälsch C. Plantas de los dioses. 2a Ed. México: Fondo de cultura económica; 2000.
30. Mayagoitia L, Díaz JL, Contreras CM. Psychopharmacologic analysis of an alleged oneirogenic plant: *Calea zacatechichi*. J of Ethnoph. 1986; 18:229-243.
31. Luke D. Psychoactive substances and paranormal phenomena: a comprehensive review. Int J of Transp Stud. 2012; 31(1):97-156.
32. Sarabia AM, Pastrana PA. Datos para la materia médica mexicana (1894 - 1908): Plantas medicinales, terapéutica y naturalismo. Circ Int J for the Hist of Sci. 2011; 9:11-28.
33. Wu H, Fronczek FR, Burandt CL, Zjawiony JK. Antileishmanial germacranolides from *Calea zacatechichi*. Planta Med. 2011; 77(7):749-753.
34. Köhler I, Jennett SK, Siems K, Hernández MA, Ibarra RA, Berendsohn WG, et al. In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. Z Naturforsch. 2002; 57:277-281.
35. Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactones containing Mexican indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappa B. FEBS Lett. 1997; 402:85-90.
36. Venegas FH, Segura CD, Vázquez CB. Antiinflammatory activity of the aqueous extract of *Calea zacatechichi*. Proc West Pharmacol Soc. 2002; 45:110-111.

37. Roman RR, Alarcon AF, Lara L, Flores SJL. Hypoglycemic effect of plants used in México as antidiabetics. *Arch Med Res.* 1992; 23:59-64.
38. Francisco Hernández. *Rerum medicarum Novae Hispaniae Thesaurus, seu Plantarum, Animalium, Mineralium Mexicanorum Historia cum notis Joannis Terentii Lineæi.* 1648. Venegas FH, Segura CD, Vázquez CB. Antiinflammatory activity of the aqueous extract of *Calea zacatechichi*. *Proc West Pharmacol Soc.* 2002; 45:110-111.
39. Lara OF, Alonso CM. Plantas medicinales de México composición, usos y actividad biológica. México: UNAM; 1996.
40. Chadwick M, Harriet T, Frances G y Wagstaff C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(6):12780–12805.
41. Gonçalves AE, Bürger C, Solomon KSA, Tolardo R, Biavatti WM, de Souza MM. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *Eur J of Pharm.* 2012; 674:307-314.
42. Ortega A, De vivar AR, Díaz E, Romo J. Determinación de las estructuras de la calaxina y de la ciliarina, nuevos germacranólidos furanónicos. *Rev Lat Quim.* 1970; 1:81-85.
43. Mc Naught AD, Wilkinson A. IUPAC compendium of chemical terminology the gold book, 2da. Ed. EUA: Blackwell scientific publications; 1997.
44. Grosso CI, Valentão P, Ferreres F, Andrade PB. The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Curr Med Chem* 2013; 20(37):4694-4719.

45. Benthosanth A, Rusznyak ST, Györgyi SA. Vitamin P. *Nature*. 1937; 139(3512):326-327.
46. Herrera RM, Roman RR, Zamilpa A, Tortoriello J, Ferrer JEJ. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. *J of Ethnoph*. 2008; 118:312-317.
47. Gong J, Huang J, Qing GE, Chen F, Zhang Y. Advanced research on the antidepressant effect of flavonoids. *Curr Opin Complement Alternat Med*. 2014; 1(2):1-6.
48. Medina MME. Epidemiología de los trastornos mentales en América Latina y el Caribe. Washinton, EUA: Organización panamericana de la salud; 2009.
49. Conway KP, Compton WS, Frederick S. Grant BF. Lifetime comorbidity of DSM-IV mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *J of Clin Psych*. 2006; 67(2):247-257.
50. Ortuño SF. Lecciones de psiquiatría. México: Editorial médica panamericana; 2010.
51. Schatzberg FA, Nemeroff CB. The american psychiatric press textbook of psychopharmacology. 2nd Ed. EUA: American Psychiatric Press; 1998.
52. Singh YN, Singh NN. Therapeutic potential of Kava in the treatment of anxiety disorders. *CNS Drugs*. 2002; 16(11):731-743.
53. Mardomingo SMJ. Psiquiatría para padres y educadores: Ciencia y arte. Madrid, España: Narcea; 2003.

54. American Psychiatric Association. DSM-V diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th Ed. London: American Psychiatric Publishing; 2013.
55. Jansen A, Nguyen X, Karpitsky V, Mettenleiter M. Central command neurons of the sympathetic nervous system: Basis of the fight-or-flight response. *Science*. 1995; 270(5236):644-646.
56. Klein S. Adrenaline, cortisol, and norepinephrine: The three major stress hormones explained. [Internet] Huffington post. [Citado el 16 Ago 2014] Disponible en: goo.gl/e2V4Aa.
57. Goldstein D, Kopin I. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007; 0(2): 109–120.
58. Cooper J, Bloom F, Roth R. The biochemical basis of neuropharmacology. 8va. Ed. Nueva York, EUA: Oxford University Press; 2003.
59. Nutt D, Malizia A. New insights into the role of the GABA_A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Brit J of Psych*. 2001; 179:390-396.
60. Cortes RC, Galindo F, Galicia-Isasmendi S, Flores A. GABA: ¿Dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. 2011. *Rev Neurol*: 52. 665-675.
61. Valenzuela HD, Negrete DV, Rogríguez MA. Núcleo coeruleus. Neurotransmisores, funciones y patología. *Anest Mex*. 2007; 19(3):155-166.
62. Sandford J, Argyropoulos S, Nutt D. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharm & Therap*. 2000. 88: 97-212.
63. Rodríguez JFL, Contreras CM. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Rev Biomed*. 1998; 9: 181-191.

64. Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huizen C. El sistema nervioso central humano. Madrid, España: Editorial médica panamericana; 2009.
65. Brüne M, Textbook of evolutionary psychiatry: The origins of psychopathology. Nueva York, EUA: Oxford University Press; 2008.
66. Dunlop BW, Davis PG. Combination treatment with benzodiazepines and SSRIs for comorbid anxiety and depression: A review. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2008; 10(3):222-228.
67. Mandos LA, Jennifer A, Rickels K. Achieving remission in generalized anxiety disorder [Internet] *Psych T* [Citado el 01 Feb 2015] Disponible en: <http://goo.gl/Mr3SPH>
68. Organización mundial de la salud. Assessment of the risk of hepatotoxicity with kava products. Suiza: WHO Press; 2007.
69. Ernst E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomed*. 2006; 13:205-208.
70. Sarris J, Panossian A, Schweitzer I, Stough C, Scholey A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011 (12):841-860.
71. Frazer A, Morilak DA. What should animal models of depression model?. *Neurosc and Behav Rev*. 2005; 29:515-523.
72. Willner P. Behavioural models in psychopharmacology. En: Willner P, editor. *Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. EUA: Cambridge university press; 1991.

73. Berk M, Williams LJ, Jacka FN, O'Neil A, Pasco JA, Moylan S. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from?. *BMC Med.* 2013; 11:200.
74. National Institute for health Care Excellence. Depression in adults: Recognition and management, clinical guideline. Reino Unido: NICE; 2009.
75. Castrén E. Is mood chemistry? *Nature Rev.* 2005; 6:241-246.
76. Manicavasagar V. A review of depression diagnosis and management [Internet] *Aus Psych Soc* [Citado el 01 Feb 2015] Disponible en: goo.gl/H6IMBP.
77. Parker G, Manicavasagar V. Modelling and managing the depressive disorders: A clinical guide. Nueva York, EUA: Cambridge university press; 2005.
78. Van Rhoads, Gelenberg AJ. Treating depression to remission: Target recovery, and give patients back their lives. *Curr Psych*; 2005(4)9:15-28.
79. Shelton RC, Keller MB, Gelenberg A, Dunner DL, Hirschfeld R, Thase ME, et al. Effectiveness of St John's wort in major depression: A randomized controlled trial. *J Ame Med Assoc.* 2001; 285(15):1978-1986.
80. Liu L, Liu C, Wang Y, Wang P, Li Y, Li B. Herbal medicine for anxiety, depression and insomnia. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(4):481-93.
81. Fava M, Uelbacker L, Alpert JE, Nierenberg AA, Pava JA, Rosenbaum JF. Major depressive subtypes and treatment response. *Biol Psych* 1997; 42:568–576.

82. Berenzon GS, Sainz TM, Medina MIME. Variables demográficas asociadas con la depresión: Diferencias entre hombres y mujeres que habitan en zonas urbanas de bajos ingresos. *Sal Ment.* 2005; 28(6):33-40.
83. Von Hoosier G. The age of biology: Opportunities and challenges for laboratory animal medicine. *Scand J Lab Anim Sci.* 1999; 26(4):176-184.
84. Zúñiga J, Tur M, Milocco S, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. México: McGraw-Hill Interamericana; 2001.
85. Anisman H, Matheson K. Stress, depression and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neurosci and Biobehav Rev.* 2005; 29:525-546.
86. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Prod.* 2007; 2:322-328.
87. Porsolt RD, Lenegre A. Experimental approaches to anxiety and depression: Behavioral models of depression. Nueva York, EUA: Willey; 1992.
88. Fernández GA, Martínez ML, Estrada CE, Contreras CM, López RC. Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacol, Biochem and Behav.* 1999; 63(1):13-20.
89. Jones BJ, Roberts DJ. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol.* 1968 (4):302-304.

90. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Braz J of Med and Biol Res.* 1997; 30:289-304.
91. Treit DJ, Pinel PJ, Fibiger HC. Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharm Bioch and Behav.* 1981; 15(4):619-626.
92. De Boer, Koolhas JM. Defensive burying in rodents: Ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharm.* 2003; 463(1-3):145-161.
93. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 266:730-732.
94. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharm.* 1995; 121(1):66-72.
95. 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 of Neurosc Meth.* 1985; 14:149-167.
96. File SE, Andrews N, Wu PY, Zharkovsky A, Zangrossi H. Modification of chlordiazepoxide's behavioral and neurochemical effects by handling and plus maze experience. *Eur J of Pharm.* 1992; 218(1):9-14.
97. File SE, Aranko K. Sodium valproate and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. *Neuropsychobiol.* 1988; 20:82-86.
98. Griebel G, Sanger DJ, Perrault G. The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and BZ-1 (omega 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharm.* 1996; 124(3):245-254.

99. Brett RR, Pratt JA. Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus maze. *Eur J Pharmacol.* 1990; 178(1):135-138.
100. Bert B, Fink H, Sohr R, Rex A. Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001; 70(2-3):411-420.
101. Griebel G, Rodgers J, Perrault G, Sanger DJ. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharm Bioch and Behav.* 1997; 57(4):817-827.
102. Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharm.* 1989; 99:48-53.
103. Silvestre JS, Fernández GA, Palacios JM. Effects of rolipram on the elevated plus-maze test in rats: A preliminary study. *J Psychopharmacol.* 1999; 13(3):274-277.
104. Drapier D, Bentue FD, Laviolle B, Millet B, Allain H, Bourin M, et al. Effects of acute fluoxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behav Brain Res.* 2007; 176(2): 202-209.
105. Lapmanee S, Charoenphandhu N, Krishnamra N, Charoenphandhu J. Anxiolytic-like actions of reboxetine, venlafaxine and endurance swimming in stressed male rats. *Behav Brain Res.* 2012; 231:20-28.
106. Blampied NM, Kirk RC. Defensive burying: Effects of diazepam and oxprenolol measured in extinction. *Life Sci.* 33:695-699.

107. Tsuda A, Ida Y, Tanak M. The contrasting effects of diazepam and yohimbine on conditioned defensive burying in rats. *Psychobiol.* 1988; 16:213-217.
108. Treit D, Pesold C. Septal lesions inhibit fear reactions in two animal models of anxiolytic drug action. *Physiol Behav.* 1990; 47:365-371.
109. Treit D, Fundytus A. Comparison of buspirone and chlordiazepoxide in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 30:1071-1075.
110. Craft RM, Howard JL, Pollard GT. Conditioned defensive burying as a model for identifying anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 30:775-780.
111. Beardslee SL, Papadakis E, Fontana DJ, Commissaris RL. Antipanic drug treatments: Failure to exhibit anxiolytic-like effects on defensive burying behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990; 35:451-455.
112. De Boer SF, Slangen JL, Van der Gugten J. Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: Effects of chlordiazepoxide. *Physiol Behav.* 1990; 47:1089-1098.
113. Czech DA, Quock RM. Nitrous oxide induces an anxiolytic like effect in the conditioned defensive burying paradigm, which can be reversed with a benzodiazepine receptor blocker. *Psychopharm.* 1993; 113:211-216.

114. Treit DJ. A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990; 36:203-205.
115. López RC, Hen R, Lorenia CS. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus maze tests: Differences in sensitivity behavior 5-HT_{1B} knockout and wild type. *Behav Brain Res.* 2000; 115:85-94.
116. Davis SF, Hazelrigg M, Moore SA, Petty ZM. Defensive burying as a function of food and water deprivation. 1981; 18:323-327.
117. Rohmer JG, Di Scala G, Sandner G. Behavioral analysis of the effects of benzodiazepine receptor ligands in the conditioned burying paradigm. *Behav Brain Res.* 1990; 38:45-54.
118. López RC, Fernández GA, Urba HR. Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: Effects of 5-HT_{1A} compounds. *Dev Psychobiol.* 1996; 29:157-169.
119. Groenik L, Van der GJ, Verdouw PM, Maes RA, Olivier B. The anxiolytic effects of flesinoxan, a 5-HT_{1A} receptor agonist, are not related to its neuroendocrine effects. *Eur J Pharmacol.* 1995; 280: 185-193.
120. Groenik L, Van der GJ, Compaan JC, Maes RA, Olivier B. Flesinoxan pretreatment differentially affects corticosterone, prolactin and behavioral responses to a flesinoxan challenge. *Psychopharm.* 1997; 131:93-100.
121. Korte SM, Bohus B. The effect of ipsapirone on behavioral and cardiac responses in the shock-probe/defensive burying test in male rats. *Eur J Pharmacol.* 181:307-310.

122. Korte SM, Bouws GAH, Koolhaas JM, Bohus B. Neuroendocrine and behavioral responses during conditioned active and passive behavior in the defensive burying/probe avoidance paradigm: effects of ipsapirone. *Physiol Behav.* 1992; 52:355-361.
123. Fernández GA, Hong E. Antianxiety effect of various putative 5-HT receptor agonists on the conditioned defensive burying paradigm. *Law Ear.* 1989; 377-382.
124. Martínez ML, Estrada CE, López RC, Contreras CM, Fernández GA. Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendoc.* 2000; 25:109-120.
125. Bondi CO, Barrera G, Danet SM, Bedard T, Mahan A, Morilak DA. Noradrenergic facilitation of shock-probe defensive burying in lateral septum of rats, and modulation by chronic treatment with Desipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31(2):482-495.
126. Olivarez NM, Fernández GA, Martínez ML. Age related changes in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in the rat forced-swim test. *Behav Pharm.* En prensa 2015.
127. Martínez ML, Fernández GA. Testosterone-dependent antidepressant-like effect of noradrenergic but not serotonergic drugs. *Pharm Biochem and Behav.* 2004; 78:711-718.
128. Carlezon WA, Pliakas AM, Parow AM, Detke MJ, Cohen BM, Renshaw PF. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biol Psychiatry.* 2002; 51:882–889.

129. Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, Zhang Y, Stevens WC, et al. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305:323-330.
130. Hemby SE, Lucki I, Gatto G, Singh A, Thornley C, Matasi J, et al. Potential antidepressant effects of novel tropane compounds, selective for serotonin or dopamine transporters. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282:727-733.
131. Reneric JP, Lucki I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharm.* 1998; 136:190-197.
132. Reneric JP, Bouvard M, Stinus L. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res.* 2002; 136:521-532.
133. Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the forced swimming test. *Psychopharm.* 1999; 147:162-167.
134. Cryan JF, Leonard BE. 5-HT_{1a} and beyond: The role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Hum Psychopharmacol.* 2000; 15:113-135.
135. Slattery DA, Desrayaud S, Cryan JF. Gaba-b receptor antagonist-mediated antidepressant-like behavior is serotonin dependent. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312:290-296.

136. Martínez ML, Cruz MJ, Márquez BS, Fernández GA. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharm Biochem and Behav.* 2008; 88:332-340.
137. Chaki S, Yoshikawa R, Hirota S, Shimazaki T, Maeda M, Kawashima N, et al. MGS0039: A potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant like activity. *Neuropharm.* 2004; 46:457-467.
138. Martínez ML, Estrada CE, López RC. Indorenate produces antidepressant-like actions in the rat forced swimming test via 5-HT_{1a} receptors. *Psychopharm.* 2002; 165:60-66.
139. Estrada CE, Fernández GA, López RC. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharm.* 2003; 28:830-838.
140. Contreras CM, Martinez ML, Saavedra M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat.* 1998; 22:1121-1128.
141. Molina HM, Téllez ANP. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendoc.* 2001; 26(5):479-91.
142. Rex A, Schickert R, Fink H. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 77:303-307.

143. Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23:238-245.
144. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana: Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Calea zacatechichi* [Internet]. UNAM [citado 01 Feb 2014] Disponible en: goo.gl/EAFVpC.
145. Sampieri RH, Fernández CC, Baptista LP. Metodología de la investigación. México: Editorial Mc Graw-Hill; 2010.
146. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y el uso de animales de laboratorio.
147. Mc Connell, Abdul W, Murdan B, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J of Pharm and Pharmacol.* 2008; 60(1):63-70.
148. Malone MH, Robichaud MC. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia.* 1962; 25 (4):320-332.
149. Malone MH. The pharmacological evaluation of natural products, general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J of Ethnoph.* 1982; 8:127-147.
150. Fernández GA, Ulloa RE, Nicolini H. Age differences in the sensitivity to clomipramine in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharm.* 2002; 166:195-201.
151. Lemini C, García AE, Cruz LB, Trejo GM, Martínez ML. Differential effect of the 17 β -aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and

- depression models in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016; 64:102-108.
152. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Behav Rev*. 2005; 29(4-5):547-569.
153. Roth KA, Katz RJ. Stress, behavioral arousal, and open field activity – a reexamination of emotionality in the rat. *Neurosci Behav Rev*. 1979; 3:247-263.
154. Todd DG, Dao DT, Kovacsics CE. The open field test. *Neuromethods*. 2009; 42:1-20.
155. Prutt L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drug on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharm*. 2003; 463:3-3.
156. Zolmann JF. *Biostatistics: Experimental design and statistical inference*. EUA: Oxford university press; 1993.
157. Kumar S, Madaan R, Sharma A. Pharmacological evaluation of bioactive principle of *Turnera aphrodisiaca*. *J of Pharm Sci*. 2008; 70:740-744.
158. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16(2):33-36.
159. Schlaepfer TE, Nemeroff CB. *Neurobiology of psychiatric disorders: Handbook of clinical neurology*. The Netherlands: Elsevier; 2012.
160. De Pablo JM, Parra A, Segovia S, Guillamón A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiol Behav*. 1989; 46(2):229-237.

161. Boix J, Cauli O, Felipo V. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neurosci.* 2010; 167: 994-1003.
162. Carballo VA, González TME, López MFJ. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. *Eur J Pain.* 2014; 18(3):396-405.
163. Páez MN, Lorenia CS, López RC. Comparative study of the effects of toluene, benzene, 1,1,1-trichloroethane, diethyl ether, and flurothyl on anxiety and nociception in mice. *Toxic and App Pharm.* 2003; 193:9-16.
164. Paladini AC, Marder M, Viola H, Wolfman C, Wasowski C, Medina JH. Flavonoids and the central nervous system: From forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51(5):519-526.
165. Tolardo R, Zetterman L, Rilo BD, Camila MT, Lazzarotto OF, Weber BM, et. al. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *J of Ethnoph.* 2010; 128:63-70.
166. Ferreira ZS, Roque NF, Gottlieb OR, Oliveira F, Gottlieb HE. Structural clarification of germacranolides from *Calea* species. *Phytochem.* 1980; 19:1481-1484.
167. Martínez M, Naveda DE. Derivados del timol de la *Calea zacatechichi* SCHDL. *Rev Lat Quim.* 1988; 19(2):56-57.
168. Martínez M, Baldomero E, Ortega A. Two caleines from *Calea zacatechichi*. *Phytochem.* 1987a; 26 (7):2104-2106.

169. Martínez M, Sánchez FA, Joseph NP. Thymol derivatives from *Calea nelsonii*. *Phytochem.* 1987b; 26 (9):2577-2579.
170. Herz W, Kumar N. Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *C. urticifolia*. *Phytochem.* 1980; (19):593-597.
171. Choi SM, Kwon JW, Kim JY, Choi SM, Lee JW, Choi JG. A composition comprising the compound isolated from *Chrysanthemum indicum* for treating or preventing cerebrovascular system involved anxiety and the use thereof. China; WO 2013147419 A1, 2013.
172. Ramírez SI y Mayagoitia NL a Cruz TA. Comunicación personal. 16 Diciembre 2015.
173. De Vivar AR. Sesquiterpene lactones in *Compositae*, biogenesis and taxonomic implications. *Rev Lat Quim.* 1977; 8:63-74.
174. Quijano L, Calderón JS, Ríos T. Los componentes de la *Calea zacatechichi* estructura de los caleocromenos A y B. *Rev Lat Quim.* 1977; (8):90-93.
175. Quijano L, de Vivar AR, Ríos T. Los componentes de la *Calea zacatechichi* estructura de las caleínas A y B. *Rev Lat Quim.* 1978; (9):86-89.
176. Quijano L, de Vivar AR, Ríos T. Revision of the structures of caleine A and B, germacrolide sesquiterpenes from *Calea zacatechichi*. *Phytochem.* 1979; (18):1745-1747.
177. Bohlmann F, Zdero C. Neue germacrolide aus *Calea zacatechichi*. *Phytochem.* 1977; 16(7):1065-1068.
178. De la Cruz B. *Libellus de medicinalibus indorum herbis.* 1552.

179. Viesca TC, Aranda A. Las alteraciones del sueño en *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. [Internet] Estudios de cultura nahuatl [Citado el 01 Feb 2014] Disponible en: goo.gl/FkNCvF.
180. Instituto Médico Nacional. Datos para la materia médica. México: IMN; 1980.
181. Sociedad Farmacéutica de México. Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México. México: Botas, 1874.
182. Stix JS. Thomas Baillie Mac-naturalist and collector. *Curator*. 1975; 18:270-280.
183. Phillips C. A shared curiosity. *Huntington frontiers*. 2006; 2(1):9-13.
184. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription nuclear factor- κ B and cancer. *Clin Oncol*. 2007; 19(2):154-161.
185. Lara OR, Márquez AC. Plantas medicinales de México. Composición usos y actividad biológica. México: UNAM, 1996.

Anexo 1. Composición fitoquímica de *Calea zacatechichi*

A continuación se listan en la tabla 4 los compuestos aislados de *Calea zacatechichi* es importante tener en cuenta que puede haber una gran variabilidad de los mismos de acuerdo a la época de recolección y su situación geográfica, entre otros ⁽³⁾.

Tabla 22. Compuestos aislados de toda la planta de <i>Calea zacatechichi</i>				
Nombre	Tipo de estructura	Tipo de extracto	Concentración	Referencias
Caleína A	Sesquiterpeno	Clorofórmico	0.00125%	170, 175, 176
Caleína B		Clorofórmico	--	170, 175
Caleína C		Clorofórmico	0.00625%	170, 176
Caleína D		Clorofórmico	--	176
Caleína E		Clorofórmico	0.02359155%	169
Caleína F		Clorofórmico	0.001408451% (VII) 0.002083% (II)	169, 170
Caleocromeno A	Heterocíclico oxigenado	Hexánico	0.0179487%	174
Caleocromeno B		Hexánico	--	174
Escualeno	Triterpeno	Hexánico	0.08974359%	174
Poliisopreno		Hexánico	--	174
Tetradeca-4,6,10,12-tetraen-8-in-1-ol	Alquenino	Hexánico	--	174
Estigmasten-5-ol-3	Esterol	Hexánico	0.0025%	167
Estigmasten-5,22-ol-3		Hexánico	0.0055%	167
Acetato de taraxasterol		Hexánico	--	174
4',7-dimetil éter de apigenina, Genkwanina	Flavonoide	Hexánico	--	34, 174

Elaborada con datos de: Martínez 1988; Herz 1980; Martínez 1987a; Quijano 1977; Quijano 1978; Quijano 1979; Martínez 1987b; Bohlman 1977, Köhler 2002. Basado en Lara 1996.

Tabla 23. Compuestos aislados de las partes aéreas de <i>Calea zacatechichi</i>				
Nombre	Tipo de estructura	Tipo de extracto	Concentración	Referencias
Budleína	Sesquiterpeno	Clorofórmico	0.000853%	170
Análogo de la budleína "3b"		Clorofórmico	0.000583%	170
Caleína A		Clorofórmico	0.00125%	170
Caleína C		Clorofórmico	0.00000066%	170
Caleína F		Clorofórmico	0.00000016%	170
Acetil erioflorina		Clorofórmico	0.003524267%	169
Germacreno A		Éter / Hexanos 2:1	0.04347826	177
1- α -acetoxi-zacatechinólido		Éter / Hexanos 2:1	0.02173913%	177
1-oxo-zacatechinólido		Éter / Hexanos 2:1	0.013043478%	177
Sesquiterpenlactona "I"		--	0.05325%	167
Sesquiterpenlactona "1a"		Clorofórmico	--	170
Sesquiterpenlactona "1b"		Clorofórmico	--	170
Zexbrevína		Clorofórmico	0.00352127% (VII)	170, 169
Acacetin		Flavonoide	Hexano / Acetato de etilo 7:3	0.20675% (I) 0.001% (II) 0.983018868%(III)
7-O-metil acacetin	Acetato de Etilo		0.7490566% (III)	168
4',7-dimetil éter de apigenina	Hexano / Acetato de etilo 4:1		0.068%	167, III, 169
Heptadeca-4,6-diino-trans-8-trans-10,16-tetraen-1-ol	Alquenino	Éter / Hexanos 2:1	--	177
Heptadeca-4,6-diino-trans-8-trans-10,16-tetraeno		Éter / Hexanos 2:1	--	177
Estigmasten-5-ol-3	Esterol	Hexánico	0.0025%	167
Estigmasten-5,22-ol-3		Hexánico	0.0055%	167

Elaborada con datos de: Martínez 1988; Herz 1980; Martínez 1987a; Martínez 1987b; Bohlman 1977. Basado en Lara 1996.

Tabla 24. Compuestos aislados de la raíz de <i>Calea zacatechichi</i>				
Nombre	Tipo de estructura	Tipo de extracto	Concentración	Referencias
Cimenol	Monoterpeno	Acetato de etilo	<0.0034722%	167
Isobutirato de cimenol		Acetato de etilo	--	167
Timol		Acetato de etilo	<0.0034722%	167
Isobutirato de timol		Acetato de etilo	--	167
Estigmasten-5-ol-3	Esterol	Acetato de etilo	<0.03229167%	167
Estigmasten-5,22-ol-3		Acetato de etilo	<0.03229167%	167

Elaborada con datos de: Martínez 1988. Basado en Lara 1996.

Anexo 2. Historia del Zacatechichi

La historia de *Calea zacatechichi* posiblemente comience desde tiempos prehispánicos, ya que en el libro *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (ver figura 18) aparece una planta bajo el nombre de *Cochizxihuitl* ⁽¹⁷⁸⁾ (del náhuatl *kochmi* “sueño”, y *xiuitl* “hierba”: hierba del sueño) cuya ilustración, en apariencia, comparte una mayor similitud anatómica con *Calea zacatechichi* que con las especies antes propuestas para su identidad, *Bocconia integrifolia* y *Russelia polyedra* ⁽¹⁷⁹⁾, por aspectos como las flores amarillas en racimo y hojas de bordes aserrados. En el códice ésta planta, combinada con otras dos plantas (una aparentemente del género *Datura* sp. y otra aún sin identificar), se emplea para elaborar un ungüento para tratar el insomnio.



Figura 18. Fragmento del códice De la Cruz Badiano. La tercera ilustración de izquierda a derecha bajo el nombre de *Cochizxihuitl* aparece el dibujo de una planta que comparte características anatómicas con *Calea zacatechichi*.

En el libro *Nova plantarum, animalium et mineralium Mexicanorum* de Francisco Hernández, existe una monografía descriptiva de una planta llamada *Chamedri mexicana* cuyo nombre en náhuatl es “Ahuapatli”, que es descrita como una planta de sabor amargo y de olor agradable. Se describen para esta planta propiedades febrífugas, analgésicas, antidiarréicas y cuya infusión es conocida como auxiliar en los problemas emocionales *affectui infusa auxiliatur*, traducido literalmente como: “La infusión es auxiliar para las emociones”. Francisco Hernández menciona en otra ocasión el uso de esta hierba en infantes para producirles el sueño: "Dicen que su jugo exprimido e instilado en la boca de los infantes les produce sueño, de donde le viene el nombre" ⁽³⁸⁾.



Figura 19. Ilustración de Francisco Hernández de *Chamedri mexicana*.

En la figura 19 se muestra una ilustración de la planta *Chamedri mexicana*, que es aparentemente conocida a nivel botánico y farmacológico como auxiliar de los problemas afectivos desde 1648, casi 2 siglos antes de que fuera “descubierta” por el botánico alemán Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal. En el año 1834 este botánico publica su descripción en la revista *Linnaea* (ver figura 20) ⁽¹⁹⁾. La planta a lo largo de su historia ha sido siempre confundida con muchas especies distintas del mismo género u otros sin ninguna relación aparente, ya sea por su aspecto similar o por que otras especies reciben también los nombres de “Zacachichic” ó “Zacatechichi”, en comunidades que no son originalmente las chontales ⁽¹⁸⁰⁾.

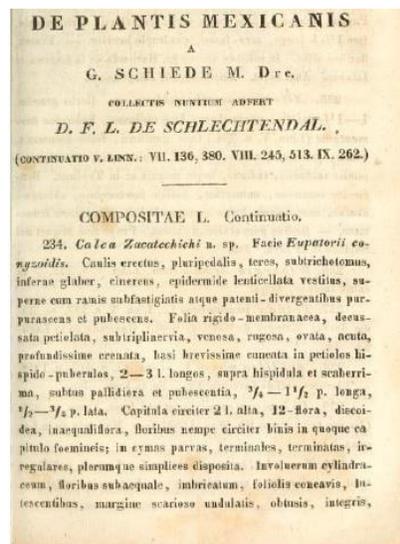


Figura 20. Fragmento de la descripción botánica de *Calea zacatechichi* realizada por Schlechtendal publicada en la revista *Linnaea*.

En 1846 en México, la Academia Farmacéutica de la Capital de la República, publica la primera farmacopea mexicana, ahí se identifica erróneamente al Simonillo (*Conyza filaginoides* comúnmente conocido como zacachichic) con el nombre de *Calea zacatechichi*. ^(180, 181).

En 1882, casi 50 años después, Miguel Sandoval escribe su tesis para obtener el título de médico cirujano, llamada "Breve estudio del Simonillo". En esta tesis confunde el nombre botánico de la planta medicinal "Simonillo" (*Conyza filaginoides*) con el de *Calea zacatechichi*, debido a que el Simonillo también es conocido como "Zacachichic" de manera tradicional ⁽¹⁸⁰⁾.

Años más tarde, en 1893 es estudiada por primera vez en México a nivel pre-clínico y clínico por un farmacéutico llamado José Terrés del Instituto Médico Nacional. La planta es ensayada en forma de extracto acuoso en perros (donde demuestra tener efectos tóxicos para los mismos) y posteriormente en humanos con el fin de verificar su efectividad como antipalúdico. En estos estudios se llegó a la conclusión de que el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* es útil para calmar las fiebres palustres, pero no es efectivo como agente antipalúdico.

En los reportes pre-clínicos es probada en los conejos perros en los cuales provoca fuertes síntomas digestivos, en los conejos incluso se menciona que finaliza con su muerte, y no se menciona ningún efecto en el SNC ⁽¹⁸⁰⁾. En 1894 el médico del IMN "J. Ramírez" publica en la obra "Datos para la materia médica" una fe de erratas acerca de la confusión provocada por el médico Miguel Sandoval, y aclara la verdadera identidad botánica del Simonillo. En este documento adjudica el error al médico Miguel Sandoval, pero curiosamente le asigna erróneamente el título de "Sr. Farmacéutico" (sic). En esta misma publicación el artista Adolfo Tenorio publica también un dibujo (ver figura 21) que él hizo de la planta de *Calea zacatechichi*, una de las primeras ilustraciones que se hayan realizado de esta especie ⁽¹⁸⁰⁾.

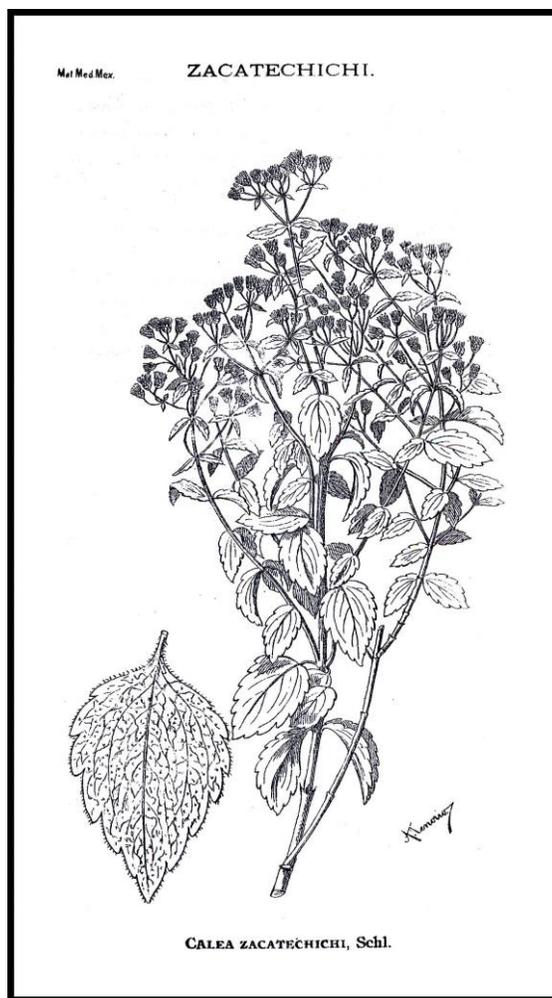


Figura 21. *Calea zacatechichi*, ilustración de Adolfo Tenorio, 1894.

La planta *Calea zacatechichi* continuará siendo usada para tratar padecimientos digestivos en general por indicaciones de la farmacopea mexicana y, posiblemente por demostrar su ineficacia como agente antipalúdico; su presencia es desestimada por la comunidad científica por un lapso de 85 años, hasta el año de 1959, cuando Francisco Giral y Samuel Labadaum reportan que la especie *Calea zacatechichi*, verificada como tal por el instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), es un “arbusto intensamente amargo”. Estos investigadores aislaron el principio amargo con un rendimiento del 0.01%,

identificando partes importantes de la estructura entre ellas la presencia de un anillo lactónico y en sus experimentos de solubilidad demostraron que el principio amargo es muy soluble en agua caliente ⁽²⁴⁾. Varios años después, en 1968, ocurre un evento que finalmente atraería bastante la atención hacia la planta, cuando el botánico norteamericano llamado Thomas Baillie MacDougall, quien trabajó durante más de 40 años en México clasificando botánicamente cactáceas en las zonas de Chiapas y Oaxaca ⁽¹⁸²⁾, publica una nota corta en el *Garden Journal*, acerca de su uso entre los chamanes chontales de Oaxaca como una herramienta de adivinación, en una ceremonia en donde era fumada y bebida en té ⁽²⁷⁾. Por entrevistas que se tuvo después con el informante de MacDougall se sabe que aunque no estuvo presente en la ceremonia, se confirmó más tarde que la información obtenida era fidedigna. Autoexperiencias y más participaciones en ceremonias reveló que la planta era consumida con el fin de recibir mensajes de tipo adivinatorio durante el sueño ^(3, 23).



Figura 21. Foto del botánico Thomas Baillie MacDougall ⁽¹⁸³⁾.

El intervalo de tiempo de 1960 a 1975 es un periodo interesante para la fitoquímica en México: Es en estos años cuando el Instituto de Química de la UNAM comienza a realizar investigaciones más profundas acerca de las plantas

medicinales mexicanas, mediante una campaña de numerosos estudios fitoquímicos enfocados en aislar y elucidar estructuralmente componentes activos de plantas de la familia *Compositae*.

El fuerte interés de la máxima casa de estudios en esta familia de plantas se debió a que notaron una enorme abundancia de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana agrupadas en ella. Se buscaban principalmente 3 tipos de estructuras: Sesquiterpenos, alcaloides y esteroides. En los resultados de esta investigación, que duró aproximadamente quince años, destaca que se hallaron principalmente sesquiterpenlactonas como los metabolitos más abundantes de las plantas medicinales de la familia *Compositae* ⁽¹⁷³⁾.

De 1977 hasta 1988 *Calea zacatechichi* fue investigada a nivel fitoquímico por investigadores nacionales que lograron extraer y caracterizar una gran variedad de de compuestos, cuya composición y concentración varía considerablemente de acuerdo a la época del año y al lugar de recolección ⁽³⁾.

En estos años se confirmó que el Zacatechichi es usado por los indios chontales durante la noche para recibir información adivinatoria durante el ensueño ^(14, 23). Mayagoitia en su viaje de recolección de material vegetal para estudio contacta al mismo informante transculturado que ayudó a MacDougall y que le brinda información acerca de que existen al menos 2 variedades de la planta: una activa y otra inactiva. El informante le confía que los conocimientos secretos le fueron heredados por su padre y otros ancianos, sin embargo él no es curandero. En sus autoexperiencias, el laboratorio de Díaz reporta que inhalar los humos del cigarro de la planta seca producirá un relajamiento que conduce a una somnolencia y

finalmente al sueño, en donde los voluntarios coinciden en la misma apreciación: Hay muchas ensoñaciones vívidas al ingerirla, también se menciona que los voluntarios al final de la experiencia experimentan una sensación de bienestar que perdura varios días. Aunque no se ha reportado la existencia de variedades de *Calea zacatechichi* sin amargor, y que posean actividad onirógena, los reportes de investigadores que obtuvieron la variedad “activa”, reportan que la variedad usada posee un sabor amargo ⁽³⁾.

Lilia Mayagoitia y cols, en 1981 realizan los primeros estudios científicos de *Calea zacatechichi* en el cerebro, evalúan los efectos de la planta en extractos hexánico y metanólico. Los extractos se administraron a gatos en forma de cápsulas con el fin de analizar sus efectos sobre la conducta, y de comparar éstos con los de varios fármacos disociativos. El método de evaluación fue mediante electroencefalograma para analizar la actividad eléctrica del sistema límbico, y así obtener información de posibles efectos tóxicos. En este estudio *Calea zacatechichi* no produjo trazos similares a los de los fármacos disociativos, razón por la cual se decidió administrarlo a humanos. Cuando el extracto fue administrado a voluntarios sanos, produjo una disminución en el tiempo de reacción y fallas en la estimación del intervalo de tiempo. Con estos estudios se demostró que *Calea zacatechichi* no posee efectos alucinatorios ni disociativos, además de que posee efectos inductores del sueño y que posiblemente aumentan los episodios REM ⁽³⁾.

Los siguientes años desde 1992 se comienzan a realizar diversos estudios a la

planta de *Calea zacatechichi*: En 1992 el Dr. Rubén Román Ramos, investigador del Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM), demuestra que la decocción de *Calea zacatechichi* administrada intraperitonealmente produce un efecto hipoglucemiante en conejos con hiperglucemia inducida con dextrosa al 50% administrada subcutáneamente ⁽³⁷⁾; en la década de los 90's comienza un gran interés de muchas empresas farmacéuticas por hallar compuestos con actividad inhibitoria del factor "NF-κB" (actividad antitumoral) ⁽¹⁸⁴⁾, lo que origina que científicos extranjeros emprendan grandes esfuerzos en estudiar plantas mexicanas en la búsqueda de estas moléculas; Börk y Schmitz evaluaron la actividad inhibitoria del factor NF-κB, por medio de un ensayo de cambio en corrida electroforética, del extracto etanólico de las hojas de 54 plantas medicinales mexicanas, de entre las cuales *Calea zacatechichi* produjo la inhibición del factor NF-κB y también produjo un retraso en el comienzo de las reacciones capilares en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (HET-CAM) lo que indica que posee actividad antiinflamatoria ⁽³⁵⁾, años más tarde en el 2002 se publica un estudio realizado en la FES Iztacala, en el cual el extracto acuoso de *Calea zacatechichi* previno la inflamación inducida por carragenina en ratas ⁽³⁶⁾. En este mismo año, en un estudio de Köhler, la planta produce efectos antiplasmódicos *in vitro* en *Plasmodium falciparum*, del extracto lipofílico se aíslan y ensayan en la misma prueba varias flavonas, de las cuales la genkwanina y el 4,7-dimetil éter de la apigenina son las más potentes años más tarde en el 2011 Wu confirma la actividad antiplasmódica y antileishmánica (*L donovani*) de 6 sesquiterpenlactonas aisladas de las partes

aéreas ⁽³³⁾.

Actualmente se están estudiando cuantitativamente sus efectos en la macroarquitectura del sueño en rata y en otras patologías en humanos ⁽¹⁷²⁾, y en el presente estudio se estudiaron sus propiedades en forma de extracto acuoso como ansiolítico-antidepresivo a dosis de 25-50 mg/kg y se determinó su incapacidad de alterar la motricidad en la misma posología. Desde 1986 hasta el 2013 han pasado casi 30 años sin que se continuara investigando formalmente los efectos terapéuticos de la planta en el SNC a pesar de que se ha demostrado que no es capaz de producir alucinaciones ⁽³⁾.