



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO MODULATORIO DEL COMPUESTO “G-1-F-2” EN
EL NÚCLEO ESTRIADO DE RATONES (*Mus musculus*)
CEPA C57/BL6.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

DANIEL ALONSO VILLARREAL

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de
México, 2019.



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.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	1
Dedicatorias	2
RESUMEN	4
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1- Sistema nervioso	5
1.2- Ganglios basales	6
1.3- Estriado	9
1.4- Plantas medicinales con efecto depresor sobre el sistema nervioso	10
1.5- ANTECEDENTES	11
1.5.1- <i>Galphimia glauca</i>	11
1.5.2- Galphimine B y Galphimine A	12
2.- JUSTIFICACIÓN	14
3.- HIPÓTESIS	15
4.- OBJETIVOS	15
5.- CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	16
5.1- Registro electrofisiológico	16
5.2- Protocolo de Pulso Pareado	17
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.- RESULTADOS	21
7.1- Efecto modulador del compuesto G-1-F-2	22
7.2- Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales GABAérgicas	24
7.3- Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales no GABAérgicas	28
8.- DISCUSIÓN	33
8.1- Efecto del compuesto G-1-F-2 y su interacción con mecanismos GABAérgicos	33
8.2- Interacción del compuesto G-1-F-2 con mecanismos glutamatérgicos	35
9.- CONCLUSIONES	37
10.- LITERATURA CITADA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1- CONEXIONES ANATÓMICAS ENTRE LOS GANGLIOS BASALES, EL TÁLAMO Y LA CORTEZA CEREBRAL.....	7
FIG. 2-ESQUEMA DE LAS VÍAS DIRECTA E INDIRECTA DE LOS GANGLIOS BASALES	8
FIG. 3-GALPHIMIA GLAUCA CAV.....	11
FIG. 4-ESTRUCTURA QUÍMICA DE GALPHIMINE-B, A Y E.....	13
FIG. 5-REPRESENTACIÓN DE UN POTENCIAL DE CAMPO.....	16
FIG. 6-FACILITACIÓN Y DEPRESIÓN POR PULSO PAREADO	18
FIG. 7-ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL MÉTODO ELECTROFISIOLÓGICO DE ESTIMULACIÓN Y REGISTRO.....	20
FIG. 8-CURVA INTENSIDAD-AMPLITUD.....	21
FIG. 9-CONTROL LARGO	22
FIG. 10-EFECTO MODULATORIO DEL COMPUESTO G-1-F-2 EN POBLACIONES NEURONALES ESTRIATALES	23
FIG. 11-RELACIÓN DE PULSO PAREADO (PPR) ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE G-1-F-2.....	24
FIG. 12-INTERACCIÓN DEL COMPUESTO G-1-F-2 CON POBLACIONES NEURONALES GABAÉRGICAS.....	25
FIG. 13-RESTA DIGITAL.....	26
FIG. 14-RELACIÓN DE PULSO PAREADO (PPR), ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE G-1-F-2	27
FIG. 15-INTERACCIÓN DEL COMPUESTO G-1-F-2 CON NEURONAS NO GABAÉRGICAS.....	29
FIG. 16-RELACIÓN DE PULSO PAREADO (PPR) ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE BICUCULINA	29
FIG. 17-RESTA DIGITAL.....	30
FIG. 18-INTERACCIÓN DEL COMPUESTO G-1-F-2 CON POBLACIONES NEURONALES DE TIPO GLUTAMATÉRGICO.....	31
FIG. 19-RELACIÓN DE PULSO PAREADO (PPR), ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE RILUZOLE	32

Agradecimientos

A la DRA. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, gracias por su apoyo, los consejos brindados, las innumerables pláticas, así como, por la confianza que deposito en mí al darme la oportunidad de ingresar a su equipo de trabajo, en donde pude encontrar otra familia, pero, sobre todo, gracias por su amistad.

Al Técnico académico M. C. Ernesto Mendoza Duarte, gracias por su gran apoyo durante el desarrollo de este trabajo, en donde su atención, su ayuda, sus consejos y su amistad fueron realmente invaluable.

Al DR. Alfredo Ortega Hernández, quien proporcionó el compuesto denominado G-1-F-2 y que, sin el cual, este trabajo no hubiera sido realizado.

Finalmente, pero no menos importantes, gracias a los amigos que tuve la oportunidad de conocer en el laboratorio 6; Ceci, Vic, Bele, Neto, Paco, Cesar, Ricardo y Edgar.

Dedicatorias

A mi Madre y a mi Padre que son mi mejor ejemplo a seguir, gracias por su sacrificio, su esfuerzo, su apoyo incondicional y su amor infinito. Este logro es de ustedes, pues yo soy en parte reflejo suyo.

A mis hermanas Itzel (Kari) y Yareni (Darla) quienes siempre han estado conmigo, gracias por todo su apoyo y sus consejos, las amo incondicional e infinitamente; ustedes siempre serán una de mis más grandes fuentes de inspiración.

A la chica que no solo es mi novia, sino también mi mejor amiga, a ti Ceci gracias por todo tu apoyo, tus consejos, pero, sobre todo, gracias por todo tu amor. Desconozco si eres el amor de mi vida, pero puedo asegurar que eres y siempre serás mi primer gran amor. Te amo infinitamente.

A las personas que tuve la oportunidad de conocer a lo largo de la carrera, aquellos a los que puedo llamar amigos, con los que me desarrollé tanto académica como personalmente Ángel, Angie, John, Ely, Gaby, Vale, Ray y José; gracias por todos los momentos y aventuras que compartimos.

Gracias a todos ustedes por brindarme el mejor regalo que puede recibir, su confianza.

"Farewell, Master burglar.
Go back to your books, and your armchair;
Plant your trees, watch them grow.
If more people valued home above gold, this world would be a merrier
place."

Thorin oakenshield

The hobbit: the battle of the five armies

*"There's only one thing I know about life.
I know some things happen by chance,
And some things happen because we make them happen..."*

Thomas Wayne

FLASPOINT

RESUMEN

En el presente estudio; por medio de registros electrofisiológicos extracelulares, se llevó a cabo la evaluación del compuesto G-1-F-2 (conformado por Galphimine-B y Galphimine-A) con el objetivo de dilucidar la existencia de un efecto modulador ejercido por dicho compuesto. De igual forma, tratamos de definir los circuitos neuronales cortico-estriatales involucrados en la modulación generada por este compuesto.

En los resultados obtenidos, pudimos observar como la aplicación del compuesto G-1-F-2 ejerce un incremento del 40% en la respuesta sináptica poblacional, corroborando la existencia de un efecto modulador ejercido por dicho compuesto. Sin embargo, al evaluar la interacción de G-1-F-2 con Bicuculina (bloqueador de los receptores GABA_A) observamos la existencia de un componente sináptico no GABAérgico afectado por las galphimines; similarmente, al evaluar la interacción de G-1-F-2 con Riluzole (inhibidor de la liberación de glutamato) observamos el incremento de la respuesta sináptica poblacional, con lo cual, se podría inferir que las galphimines no interactúan directamente tanto con mecanismos GABAérgicos como con mecanismos glutamatérgicos. No obstante, los datos obtenidos no son los suficientes como para determinar tanto el mecanismo de acción de las Galphimines, así como, los circuitos neuronales involucrados en este.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- Sistema nervioso

Los seres vivos tienen la capacidad de detectar, procesar e interpretar estímulos medio ambientales ejerciendo una o varias respuestas según las necesidades propias del organismo, algunos grupos de animales (cnidarios, platelmintos, moluscos, artrópodos y cordados) han desarrollado una compleja red de estructuras especializadas, conocida como sistema nervioso, el cual, tiene por finalidad controlar, regular y mediar tanto el funcionamiento como los procesos de comunicación del organismo (Sandoval, 2016).

En los seres humanos el sistema nervioso es un conjunto de elementos anatómicos que reciben, integran y correlacionan distintos tipos de información con la finalidad de coordinar y regular las repuestas tanto internas como externas del organismo; anatómicamente el sistema nervioso se encuentra dividido en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP); mientras que el SNC está conformado por el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico) y la medula espinal, el SNP se compone de nervios y ganglios (simpáticos, parasimpáticos y entéricos) (Langley *et al.*, 1981; Waxman, 2011; Quiroz, 2012). La unidad mínima funcional del sistema nervioso son células especializadas llamadas neuronas, estas células no funcionan de manera aislada, ya que se encuentran organizadas en conjuntos denominados circuitos neuronales, que a su vez están constituidos por tres tipos básicos de neuronas. A las células que conducen la información desde la periferia hacia el cerebro y/o al cordón nervioso se les denomina neuronas aferentes o sensitivas, mientras que, aquellas que conducen la información del cerebro hacia la periferia son conocidas como neuronas eferentes o motoras, por último, las neuronas que funcionan como puente entre las neuronas aferentes y eferentes, son conocidas como interneuronas (Langley *et al.*, 1981). A los circuitos neuronales que procesan el mismo tipo de información e interaccionan entre sí se les considera como sistemas neuronales (Waxman, 2011).

Los ganglios basales son un claro ejemplo de sistemas neuronales, ya que, son una red de estructuras altamente organizadas que se encuentran interconectadas entre sí interviniendo en procesos tanto motores como sensitivos; además, se sabe que el daño o desorganización en cualquiera sus componentes, se traduce en el deterioro de los circuitos neuronales, lo que a su vez, produce diferentes alteraciones motores, como, los trastornos hiperkinéticos (movimientos anormales excesivos) y los trastornos hipocinéticos (ausencia o lentitud de movimientos) (Snell, 2006; Purves *et al.*, 2015).

1.2- Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales que se localizan topográficamente en la parte ventral de los hemisferios cerebrales, relacionados directamente con la corteza cerebral, el cerebelo y el tálamo, constituyen un sistema integral que garantiza la intervención, organización y ejecución de procesos motores, cognitivos y de asociación (Álvarez *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2012). En primates, los GB se encuentran conformados anatómicamente por cuatro núcleos; el núcleo estriado (conformado por los núcleos caudado y putamen), el globo pálido (tanto en su segmento interno como externo), el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (pars compacta y pars reticulata) (Bargas & Galarraga, 2000; Afifi & Bergman, 2006; Ávila-Luna & Bueno-Nava, 2014). Estas estructuras se encuentran mediadas en su mayoría por neuronas de naturaleza GABAérgica, es decir, neuronas que utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor; no obstante, existen pequeñas poblaciones neuronales que utilizan otro tipo de neurotransmisor, como las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta o las interneuronas acetilcolinérgicas del estriado (Fig.1) (Bolam *et al.*, 2009).

La principal entrada de información hacia los ganglios basales es el núcleo estriado (núcleo de entrada), el cual, recibe una gran cantidad de aferencias excitatorias glutamatérgicas procedentes del tálamo y la corteza cerebral, por otra parte, los núcleos de salida (globo pálido, núcleo subtalámico, sustancia nigra reticulada) proyectan hacia la corteza cerebral por medio del tálamo, completando

de esta manera el circuito (Bolam *et al.*, 2009; Ávila-Luna & Bueno-Nava, 2014; Gómez-Chavarín *et al.*, 2014).

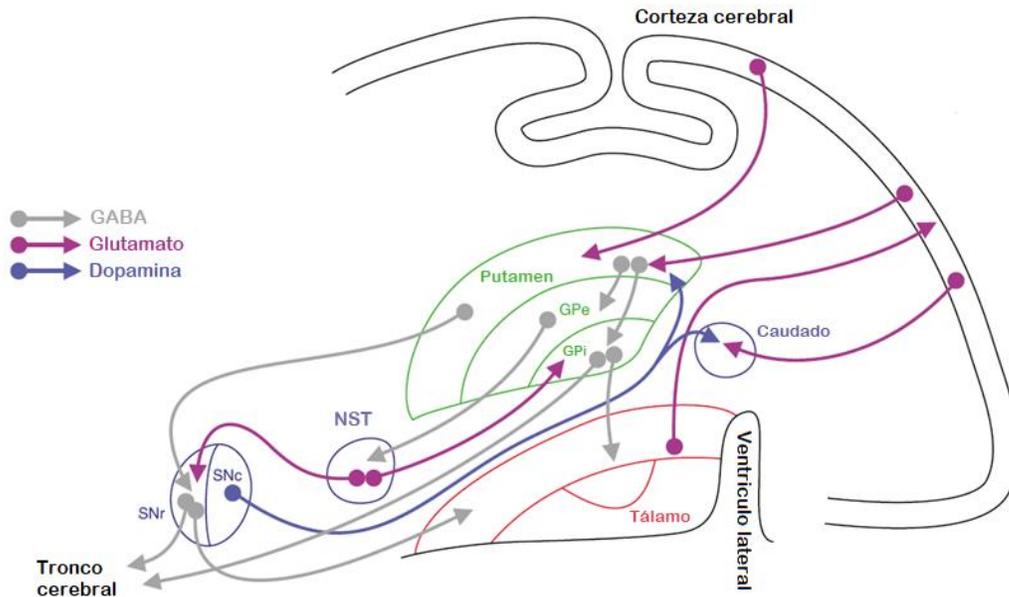


Fig. 1- Conexiones anatómicas entre los ganglios basales, el tálamo y la corteza cerebral. En donde: GPe = globo pálido externo; GPi = globo pálido interno; NST = núcleo subtalámico; SNc = sustancia nigra pars compacta; SNr = sustancia nigra pars reticulata. Se pueden observar los principales neurotransmisores involucrados en las conexiones sinápticas. (Figura tomada y modificada de Lewis *et al.*, 2003).

Las conexiones entre el núcleo de entrada (estriado), y los núcleos de salida (globo pálido, núcleo subtalámico, sustancia nigra reticulada) se encuentran organizadas en dos sistemas paralelos de proyección, los cuales, forman una “vía directa” y una “vía indirecta”. La vía directa (Fig.2) es un circuito que comienza con la recepción de aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral y tálamo que son proyectadas hacia el núcleo estriado (núcleo de entrada), subsecuentemente las neuronas estriatales proyectan hacia el segmento interno del globo pálido y a la porción reticular de la sustancia nigra (núcleos de salida), los cuales conducen la información de vuelta a la corteza por medio del tálamo; como resultado de la activación neuronal de esta vía se genera una desinhibición de las proyecciones excitatorias tálamo-corticales que proyectan hacia los circuitos premotores corticales, generando la estimulación de la corteza, lo que se traduce

como la selección y facilitación del movimiento voluntario (Lewis *et al.*, 2003; Kreitzer & Malenka, 2008; Purves *et al.*, 2015). De manera contraria, la vía indirecta (Fig.2) surge de la proyección de neuronas estriatales que forman sinapsis inhibitorias con neuronas GABAérgicas del globo pálido externo, el cual, proyecta con neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico (NST); que a su vez, forma conexiones excitatorias con el globo pálido interno y con la sustancia nigra pars reticulata, conectando con el tálamo y posteriormente con la corteza, por lo que, la función de la vía indirecta es la inhibición de neuronas de proyección tálamo-corticales, reduciendo de esta manera la estimulación cortical premotora generando la supresión de movimientos motores inapropiados (Lewis *et al.*, 2003; Kreitzer & Malenka, 2008; Purves *et al.*, 2015).

De manera simplificada se puede decir que la vía indirecta es antagonista y complementaria de la vía directa, ya que, en conjunto funcionan como un interruptor que permite abrir o cerrar las puertas fisiológicas que inician y terminan los movimientos (Purves *et al.*, 2015).

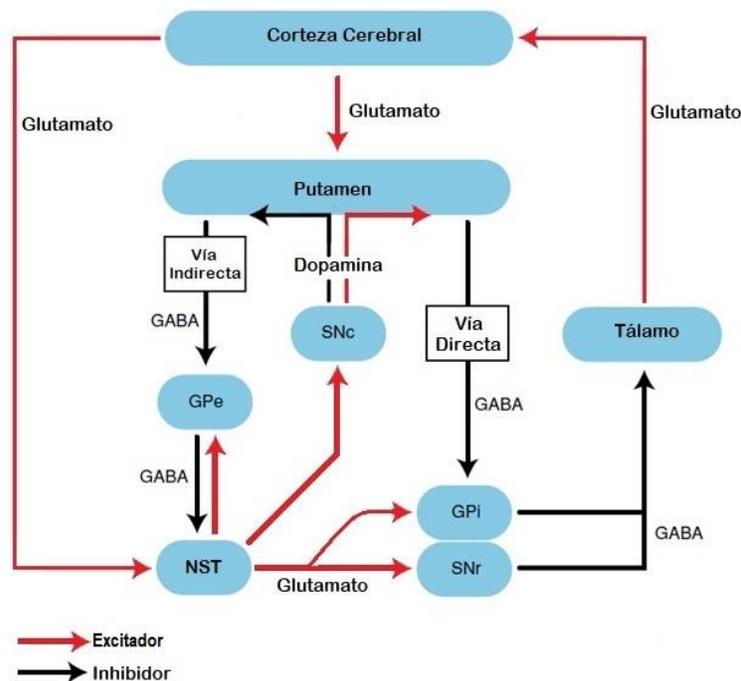


Fig. 2-Esquema de las vías directa e indirecta de los ganglios basales.- En donde: **GPe**= Globo pálido segmento externo, **GPI**= Globo pálido segmento interno, **NST**= Núcleo subtalámico, **SNr**= Sustancia nigra pars reticulata, **SNc**= Sustancia nigra pars compacta; en rojo se muestran las proyecciones excitatorias mientras que en negro las proyecciones inhibitorias. La activación de la

vía directa causa la inhibición del GPi y la SNr conduciendo a la desinhibición del tálamo y consecuentemente a la estimulación de la corteza y a la facilitación de movimiento. De manera contraria y complementaria la Vía indirecta estimula las neuronas del GPi y la SNr por medio de la inhibición del GPe y el NST, estimulando de esta manera la inhibición de proyecciones tálamo-corticales, generando la supresión de movimientos motores (Figura tomada y modificada de Lewis *et al.*, 2003).

1.3- Estriado

El núcleo estriado es el componente más grande de los ganglios basales, anatómicamente está conformado por la unión del núcleo caudado con la porción dorsal del putamen, por medio de fibras que se extienden a través de la capsula interna (Purves *et al.*, 2015). Aproximadamente el 95% de la población neuronal estriatal se encuentra conformada por neuronas de proyección de naturaleza GABAérgica, conocidas como neuronas espinosas medianas (MSNs por sus siglas en inglés), no obstante, el resto de las poblaciones neuronales pertenecen a diferentes tipos de interneuronas (colinérgicas, dopaminérgicas, GABAérgicas; contenedoras de parvalbumina, somatostatina, neuropéptido Y) (Afifi & Bergman, 2006; Tepper & Plenz, 2006; Bolam *et al.*, 2009). Las MSNs además de utilizar GABA como neurotransmisor también utilizan diferentes neuropéptidos, entre los que están incluidos la sustancia P, encefalina, neurotensina y dinorfina, e igualmente, estas células expresan altos niveles de receptores dopaminérgicos (D₁ y D₂), receptores muscarínicos (M₄) y receptores de adenosina (A₂) (Tepper & Plenz, 2006; Bolam *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2013).

El núcleo estriado es una estructura subcortical de vital importancia, ya que recibe, procesa e integra la información originada en la corteza cerebral y el tálamo, generando patrones motores basados en experiencias, mediante la intervención de circuitos neuronales locales responsables tanto de la facilitación e inhibición del movimiento, así como, de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Crittenden & Graybiel, 2011; Do *et al.*, 2013); se sabe que el daño de este núcleo o de alguno de sus microcircuitos, se encuentra altamente asociado a alteraciones neurológicas, como el Balismo, la Atetosis y el síndrome de Tourette, de igual manera, las alteraciones en el estriado son un factor implicado en el desarrollo de

enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington o Parkinson (Afifi & Bergman, 2006; Snell, 2006).

1.4- Plantas medicinales con efecto depresor sobre el sistema nervioso

México es catalogado como un país megadiverso debido a la gran cantidad de especies tanto animales como vegetales registradas en él (Challenger & Soberón, 2008), no obstante, también presenta una gran riqueza cultural que se encuentra diversificada en alrededor de 68 grupos étnicos distribuidos en 494 municipios del país (INEGI, 2016), estos grupos poseen información empírica sobre el uso (antiséptico, antibacterial y antiinflamatorio), aplicación y/o consumo de diversas plantas para el tratamiento de diversas enfermedades “populares” como diarrea, gripe, cólicos, dolores articulares, fiebre, tos, insomnio, hiperactividad, nerviosismo, etc. Se ha estimado que alrededor de 4,000 especies vegetales son utilizadas por estos grupos; sin embargo, tanto la evaluación como la validación química, farmacológica y biomédica solo se han realizado en el 5% de estas especies (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010; Gómez-Álvarez, 2012; Guzmán *et al.*, 2014), por lo que, el estudio de especies vegetales como, *Agastache mexicana* (Toronjil morado), *Cinnamomum sp.* (Canela), *Chiranthodendron pentadactylon* (Flor de manita), *Foeniculum vulgare* (Hinojo), *Ipomoea stans* (Tumba vaquero), *Galphimia glauca* (Calderona amarilla), *Passiflora suberosa L.* (Pasiflora), *Pasiflora caerulea* (Pasiflora), *Humulus lupulus* (Lúpulo), *Panax ginseng* (Ginseng), *Tilia europea* (Tila), *Valeriana officinalis* (Valeriana), *Brugmansia candida Pers* (Florifundio o Floripondio), *Helianthus annuus L.* (Girasol), *Heteropterys beecheyana A. Juss.* (Bejuco), utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades nerviosas populares (ansiedad, insomnio, nerviosismo, hiperactividad, depresión) (Pérez & Gonzales, 2015; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana^A, 2018), proporciona información sobre los principios activos que poseen estos organismos y sus potenciales efectos ansiolíticos, sedantes y/o tonificantes sobre el sistema nervioso (Ortiz-Caltempa, 2008).

1.5- ANTECEDENTES

1.5.1- *Galphimia glauca*

Galphimia glauca Cav. (Fig.3), es una especie vegetal nativa de México que pertenece a la familia Malpighiaceae, de manera popular es conocida como: calderona amarilla, ramo de oro, flor de diciembre, hierba del piojo, flor estrella y árnica roja (Pérez & Gonzales, 2015). En México, esta planta se encuentra distribuida principalmente en los estados de Guerrero, Michoacán, San Luis potosí, Morelos, Chiapas, Sonora y Guanajuato en altitudes que van de los 920 a los 2600 metros sobre el nivel del mar; tiene un crecimiento silvestre asociado a vegetación perturbada en pastizales, matorrales y bosques (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana^B 2018). En la medicina tradicional mexicana, se utiliza la infusión de las partes aéreas de *G. glauca* como sedante y/o tranquilizante nervioso, principalmente para el tratamiento de enfermedades como el estrés, miedo, nerviosismo, ansiedad e insomnio (González-Cortazar *et al.*, 2014; Avilés-Montes *et al.*, 2015).



Fig. 3-*Galphimia glauca* Cav.- Arbusto de 1 a 3 metros de altura, con hojas ovadas o alargadas de color verde en la parte superior y verde azulado en la parte inferior, las flores se encuentran en racimos de color amarillo, con un fruto en forma de capsula pequeña (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana^B 2018; Imagen tomada de Tortoriello *et al.*, 2011).

1.5.2- Galphimine B y Galphimine A

Debido al uso de *G. glauca* en la medicina tradicional mexicana, se han realizado diversos estudios que tienen por objetivo el dilucidar los efectos producidos por esta especie vegetal sobre el sistema nervioso. Los resultados obtenidos mediante la separación, identificación y aplicación del extracto metanólico de *G. glauca* en modelos neurofarmacológicos mostraron la inhibición del 95% de las contracciones peristálticas de íleon de cobayo, la disminución en el número de convulsiones inducidas con estriknina, así como, un efecto potencializador del pentobarbital sódico, generado por la fracción más activa del extracto metanólico, denominada "G-1-F-2"; sugiriendo de esta manera, la existencia de compuestos ansiolíticos que actúan sobre el sistema nervioso central (Tortoriello, 1991; Tortoriello & Lozoya, 1992; González-Cortazar *et al.*, 2014). Con el fin de evaluar la actividad antidepresiva del extracto estandarizado de *G. glauca*, Herrera-Ruiz *et al.*, en 2005, realizaron pruebas conductuales (laberinto elevado, luz-obscuridad y natación forzada) en ratones, observando diferencias significativas entre el comportamiento de los ratones tratados con el extracto de *G. glauca* y aquellos que fueron tratados con diazepam (ansiolítico estándar), demostrando la alta similitud entre el efecto ejercido por el extracto estandarizado y el efecto ansiolítico ejercido por el diazepam; concluyendo que el extracto estandarizado de *G. glauca* ejerce un efecto ansiolítico sobre el sistema nervioso. Por otra parte, en el año 2007 Aguilar-Santamaría *et al.*, realizaron la evaluación toxicológica y citotóxica de diversos extractos (acuoso, metanólico y etanólico) de *G. glauca*; administrándolos subcrónicamente en altas dosis, también evaluaron los efectos fármaco-toxicológicos producidos por dichos extractos; los resultados no mostraron ningún tipo de efecto apoptótico y/o necrótico, de manera complementaria los análisis histopatológicos de hígado, páncreas, corazón, riñón, pulmón, estómago y cerebro no revelaron ninguna alteración bioquímica e histológica, por lo que, concluyeron que los extractos de *G. glauca* no presentan ningún efecto toxicológico y/o citotóxico.

Similarmente por medio de estudios fitoquímicos realizados a los diversos extractos de *G. glauca*, se logró la identificación de una serie de nor-se-co-triterpenos, compuestos conformados por 30 carbonos dispuestos en cuatro anillos con seis carbonos cada uno y un quinto anillo heterocíclico, denominados “Galphimines”. Posteriormente mediante la separación biodirigida de estos extractos, se identificaron varias Galphimines (Galphimine-B, Galphimine-A y Galphimine-E) (Fig.4), consideradas como los principios activos de esta especie vegetal y las causantes de los efectos depresores en el sistema nervioso central (Toscano *et al.*, 1993; Lara-Ochoa *et al.*, 2005; Tortoriello *et al.*, 2006; Cardoso-Taketa *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012; González-Cortazar *et al.*, 2014).

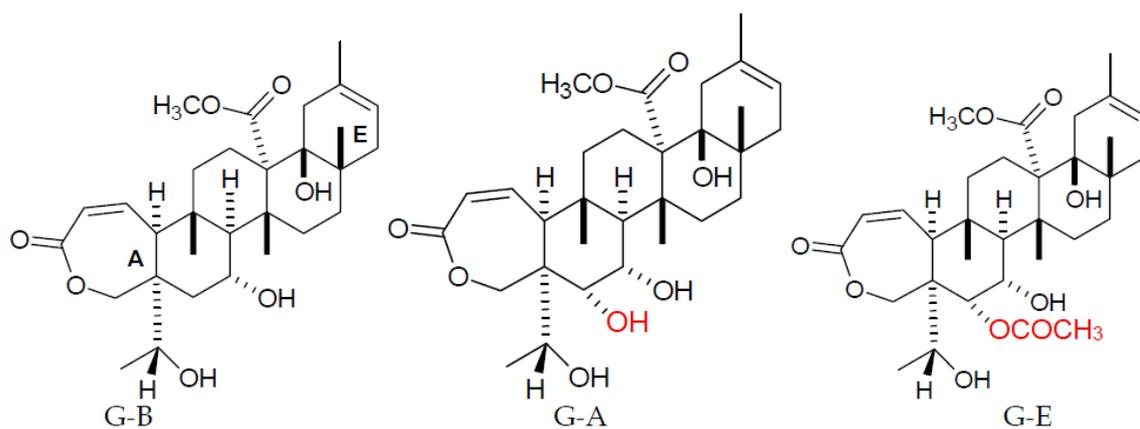


Fig. 4-Estructura química de Galphimine-B, A y E.- Se puede observar la alta similitud estructural entre las moléculas, así como, la variación (marcada en rojo) que radica en un grupo funcional del carbono seis, ya que, mientras en G-B se presenta un hidrogeno, en G-A existe un grupo hidroxilo y en G-E se tiene un grupo acetiloxi (Figura modificada de Tortoriello *et al.*, 2011).

Para poder determinar el proceso de absorción sangre-cerebro de Galphimine-A (G-A), Abarca *et al.*, en 2014 realizaron un estudio farmacocinético, en el cual, por medio de la administración oral de G-A y la cuantificación en plasma y tejido cerebral, obtuvieron la concentración máxima de G-A en el cerebro (2.74µg/ml), así como el tiempo de retención (81.6min) y el tiempo de decaimiento (24h) de esta molécula; los resultados sugieren que G-A tiene el potencial de atravesar la barrera hematoencefálica, debido a las propiedades lipofílicas de la molécula. Y debido a que las diversas Galphimines poseen una estructura altamente similar es muy probable que cualquier tipo de Galphimine presente el potencial de atravesar

esta barrera. Por otra parte, resultados de pruebas electrofisiológicas exponen la existencia de un efecto modulador en la actividad neuronal del Área Tegmental Ventral (AVT) producido por G-B y aunque se detectaron cambios en la frecuencia de neuronas GABAérgicas, los resultados muestran un mayor efecto inhibitorio en la frecuencia de descarga de neuronas dopaminérgicas, lo cual, indica la inhibición selectiva de G-B hacia las neuronas dopaminérgicas del ATV (Tortoriello *et al.*, 1998; Prieto-Gómez *et al.*, 2003). Del mismo modo, resultados obtenidos mediante registros electrofisiológicos demostraron que G-B es capaz de modificar la frecuencia de disparos espontáneos en la actividad eléctrica de neuronas hipocámpales de la región CA1, actuando posiblemente como un modulador en los sistemas de neurotransmisores involucrados en la patología de la ansiedad, no obstante, no se logra determinar a las poblaciones neuronales involucradas en esta modulación (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2011).

2.- JUSTIFICACIÓN

Con base en los antecedentes descritos, es posible suponer que el efecto ejercido por las Galphimines sobre el sistema nervioso central, se debe a la interacción de estas moléculas con diversos sistemas de neurotransmisores (principalmente de tipo GABAérgicos) generando la modulación del estriado; y ya que este núcleo es la principal entrada hacia los ganglios basales y a los circuitos neuronales motores (Afifi & Bergman, 2006; Snell, 2006), el efecto ejercido por estas moléculas se podría traducir en la regulación o inhibición del movimiento; no obstante, no se encuentra literatura que esclarezca completamente el efecto (ansiolítico y/o sedante) ejercido por estas moléculas, además de desconocer tanto los mecanismos de acción como los circuitos neuronales involucrados en dicho efecto. En este trabajo se trató de esclarecer el efecto generado por estas moléculas, así como, determinar la posible interacción entre las Galphimines y poblaciones neuronales estriatales.

3.- HIPÓTESIS

Debido a los diferentes efectos depresores sobre el sistema nervioso central, producidos por la aplicación de Galphimine-B y Galphimine-A; suponemos que el compuesto G-1-F-2 (conformado por estas dos moléculas) podría generar la potenciación de la respuesta neuronal inhibitoria estriatal, mediante la modulación de mecanismos de tipo GABAérgicos.

4.- OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto generado por el compuesto G-1-F-2 en el núcleo estriado de ratones (*Mus musculus*).

Objetivos particulares

- Determinar si el compuesto G-1-F-2 genera un efecto modulador sobre la actividad neuronal estriatal.
- Definir los circuitos neuronales estriatales, que se ven involucrados en la modulación generada por el compuesto G-1-F-2.

5.- CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

5.1- Registro electrofisiológico

El registro electrofisiológico extracelular es una herramienta que permite detectar los cambios en la actividad eléctrica (voltaje) entre la membrana celular y el espacio extracelular de ciertas poblaciones neuronales (Fanjul de Moles & Hiriart, 2008). En este trabajo realizamos el registro electrofisiológico de los potenciales de campo.

Los potenciales de campo son registros extracelulares evocados por la generación de corrientes iónicas (llamadas espigas) asociadas a la actividad poblacional neuronal; la amplitud de estas espigas depende del número de células que disparan sincrónicamente potenciales de acción; los cuales, tienden a formar una onda trifásica producida por la diferencia de potencial, que se debe al cambio en la localización de corrientes entrantes activas (pozos) y las corrientes salientes (fuentes) que cierran el circuito. En el registro extracelular las corrientes salientes se observan como deflexiones positivas, mientras que las corrientes entrantes como deflexiones negativas (Fig.5); siendo el componente negativo el correspondiente a la despolarización de la membrana causada por la corriente entrante (Silva, 2011).

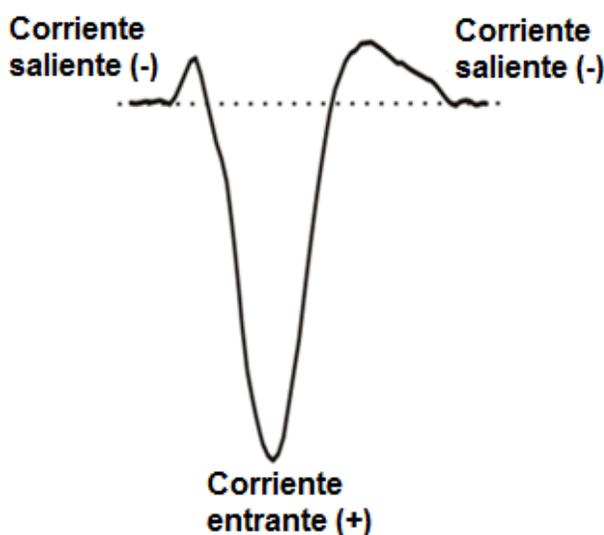


Fig. 5-Representación de un potencial de campo.- Los potenciales de campo tienden a una forma trifásica debido a la manera de propagación del potencial (corrientes entrantes y salientes) a lo largo de la neurona. Cuando el potencial se aproxima al electrodo de registro, este, detecta una corriente saliente (-) que se traduce como una onda positiva, al ser despolarizada la membrana por la corriente entrante (+), esta es detectada por el electrodo a manera de una onda negativa, finalmente al repolarizarse la membrana, se detecta una segunda corriente saliente (-) y por consiguiente una segunda onda positiva (imagen tomada de Morán, 2013).

5.2- Protocolo de Pulso Pareado

El protocolo de pulso pareado es una metodología que consiste en la aplicación de dos estímulos de la misma intensidad y duración, separados por un corto periodo de tiempo, 50 milisegundos entre cada uno. Esto genera que la respuesta al segundo estímulo se vea influenciada por el primero, resultando en el incremento o decremento de la amplitud de la respuesta sináptica; este fenómeno puede ser explicado mediante la “Teoría de calcio residual”, en la que se propone que al ejercer un primer estímulo (E_1) los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ubicados en la terminal presináptica, son activados induciendo el incremento de la concentración intracelular de este ion, al incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular se propicia la fusión mediante exocitosis de las vesículas sinápticas (las cuales contienen y transportan diferentes neurotransmisores) con la membrana plasmática liberando de esta manera el neurotransmisor en el espacio sináptico. No obstante, ya que el mecanismo de recaptura de Ca^{2+} intracelular es más lento en comparación con los sistemas de entrada de este ion, al aplicar un segundo estímulo (E_2), el Ca^{2+} que ingresa con este nuevo estímulo se integra (suma) al Ca^{2+} que ingresó con el primero; y al ser mayor la cantidad de Ca^{2+} intracelular incrementa la probabilidad de fusión de las vesículas sinápticas, lo que a su vez aumenta la liberación del neurotransmisor. Este fenómeno es conocido como facilitación por pulso pareado (PPF por sus siglas en inglés) (Fig.6) ya que la segunda respuesta es más grande que la primera, debido a la facilitación en la liberación del neurotransmisor.

Por el contrario, existe la probabilidad de que la intensidad del primer estímulo sea tan grande que cause la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula, generando la liberación de la mayoría del neurotransmisor existente en la terminal presináptica, por lo que, la eficacia de liberación del segundo estímulo será menor en comparación a la del primero debido a la falta de neurotransmisor disponible en la terminal, ocasionando un fenómeno conocido como depresión por pulso pareado (PPD por sus siglas en inglés) (Fig.6) (Johnston & Miao-Sin, 1995; Colino *et al.*, 2002; Fanjul de Moles & Hiriart, 2008).

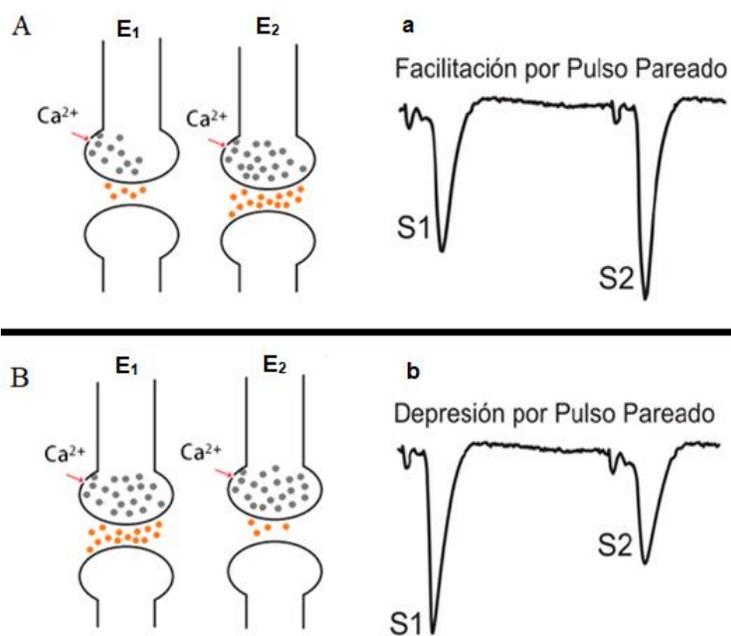


Fig. 6-Facilitación y Depresión

por pulso pareado.- En A se observa como al ejercer un estímulo (E_1), los canales de calcio dependientes de voltaje son activados, permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula, generando la fusión entre las vesículas sinápticas (círculos grises) y la membrana celular, liberando de esta manera el neurotransmisor (círculos naranja), sin embargo, al ejercer un segundo estímulo (E_2), el Ca^{2+} que ingresa a la célula se suma al Ca^{2+} residual del primer estímulo,

aumentando la probabilidad de fusión de las vesículas y por consiguiente aumentando la liberación de neurotransmisor; este fenómeno (como se muestra en **a**), se traduce en el aumento de tamaño en la segunda espiga (S2) en comparación con la primera (S1). Por el contrario en **B**, se muestra la entrada masiva de Ca^{2+} provocada por un primer estímulo, generando la liberación de la mayoría del neurotransmisor existente, por lo que, aunque se permita la entrada de Ca^{2+} extracelular con un segundo estímulo y este se suma al Ca^{2+} residual del primero, al no existir suficiente neurotransmisor en las vesículas se producirá una depresión, la cual, se registra como la disminución en el tamaño de S2 en comparación al tamaño de S1, tal y como se representa en **b** (modificada de Morán, 2013).

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa C57/BL6 (Harlan, México) con alrededor de 3 a 4 semanas de edad. Los individuos fueron colocados en cajas de acrílico transparente con libre acceso al alimento y al agua, bajo ciclos de 12 horas luz/obscuridad a una temperatura de 24-26°C.

Fármacos

El compuesto G-1-F-2 fue caracterizado bajo la metodología descrita por Tortoriello en 1991 y proporcionado por el Dr. Alfredo Ortega Hernández, que se

encuentra adscrito al Instituto de Química de la UNAM. Para la aplicación de dicho compuesto fue necesario realizar una dilución 1mg/1ml, en la que, el compuesto G-1-F-2 fue disuelto en Dimetil-sulfóxido. Del mismo modo, se utilizó un antagonista de los receptores GABA_A, llamado Bicuculina (10µM) (Mendoza *et al.*, 2014) así como, un inhibidor de la liberación de glutamato llamado Riluzole (10µM) (Cepeda *et al.*, 2003), ambos fármacos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México.

Preparación del tejido

Los ratones fueron anestesiados con éter etílico previo a ser sacrificados por decapitación, inmediatamente después del sacrificio se realizó la extracción cerebral, una vez extirpado el cerebro, se retiraron tanto el cerebelo como los bulbos olfatorios. El cerebro restante fue colocado en una solución fisiológica isotónica (simula el líquido cerebro-espinal) a 4°C, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ y con un pH de 7.4; constituida por: CaCl₂ (2mM), NaCl (125mM), KCl (3mM), MgCl₂ (1mM), NaHCO₃ (26nM), ácido ascórbico (0.2mM), tiourea (0.2mM) y glucosa (10mM). Posteriormente, los hemisferios cerebrales fueron separados y colocados en un vibratomo (Pelco® 102, 1000 plus, USA), donde se realizaron cortes sagitales de 400µm, obteniendo de esta manera rebanadas cerebrales. Subsecuentemente, las rebanadas se mantuvieron en solución fisiológica isotónica con un flujo constante de 95% O₂ y 5% CO₂ a temperatura ambiente durante una hora, lo cual permite la viabilidad del tejido por un periodo mayor a 10 horas (Mendoza, 2001).

Registro electrofisiológico

Las rebanadas cerebrales obtenidas, fueron colocadas en una cámara de registro electrofisiológico con una perfusión constante de 1±0.5ml/min de solución fisiológica saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ y una temperatura constante de 32±0.5°C. Los registros electrofisiológicos fueron realizados en la parte dorsolateral del estriado, estimulando con un electrodo bipolar ubicado sobre el cuerpo caloso, registrando la respuesta con un segundo electrodo de borosilicato (lleno con solución fisiológica) situado dentro del estriado, posicionado de 2 a 3

mm de diámetro del electrodo de estimulación (Fig.7); todos los registros fueron realizados *in vitro*, bajo el protocolo de pulso pareado, en el cual, los pulsos estaban separados por un periodo de 50 milisegundos a una frecuencia de 0.1 Hz. (Mendoza *et al.*, 2014).

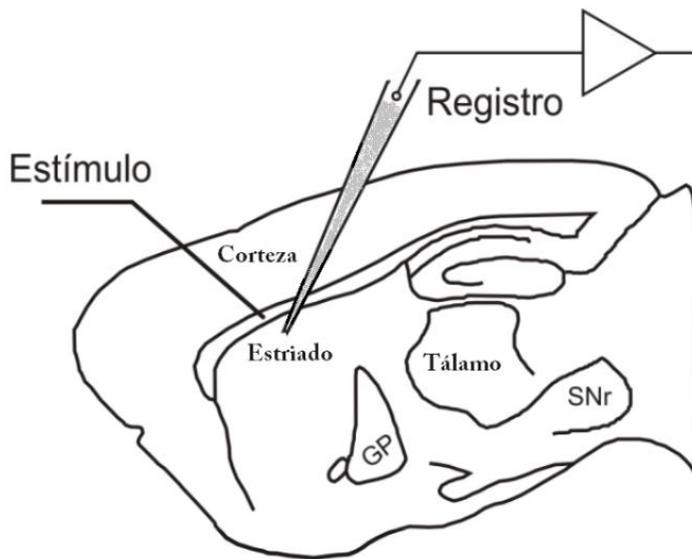


Fig. 7-Esquema representativo del método electrofisiológico de estimulación y registro.- En donde GP= Globo Pálido, SNr= Sustancia Nigra reticulata. Se observa el posicionamiento tanto del electrodo de estimulación que se encuentra en el cuerpo calloso, así como, el electrodo de registro ubicado en el cuerpo estriado (imagen tomada y modificada de Morán, 2013).

Con el objetivo de poder apreciar los cambios en la amplitud de la respuesta sináptica evocada, se llevó a cabo al inicio de cada experimento el registro de la actividad sináptica estriatal en su estado basal (control corto). Y con la finalidad de identificar los circuitos neuronales estriatales afectados por el compuesto G-1-F-2, se utilizó un antagonista competitivo de los receptores GABA_A, llamado Bicuculina, con el que se bloqueó la respuesta rápida GABAérgica (Mendoza *et al.*, 2014), por otra parte y de manera complementaria se utilizó Riluzole (es un compuesto orgánico derivado de benzotiazol), del que se ha propuesto que en concentraciones bajas (10µM) inhibe la liberación de glutamato (Urbani & Belluzzi., 2000; Cepeda *et al.*, 2003).

Finalmente, los datos obtenidos fueron procesados, analizados y graficados con el software Origin Pro 9.1.0 (USA). Los análisis estadísticos (prueba de t pareada, Test de normalidad Shapiro-Wilk, Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Análisis de Varianza-ANOVA) de los datos obtenidos, fueron realizados con ayuda del software SigmaPlot 12.0; estableciendo una significancia estadística de $P \leq 0.05$.

7.- RESULTADOS

Para poder observar cambios en la respuesta sináptica poblacional (RSP) realizamos curvas intensidad-amplitud (Fig.8) al inicio de cada experimento; determinando así la estimulación media necesaria para evitar la saturación de la RSP evocada, ya que, en estas condiciones es posible apreciar cambios en la respuesta sináptica causados tanto como por la aplicación del compuesto G-1-F-2, como por los fármacos utilizados.

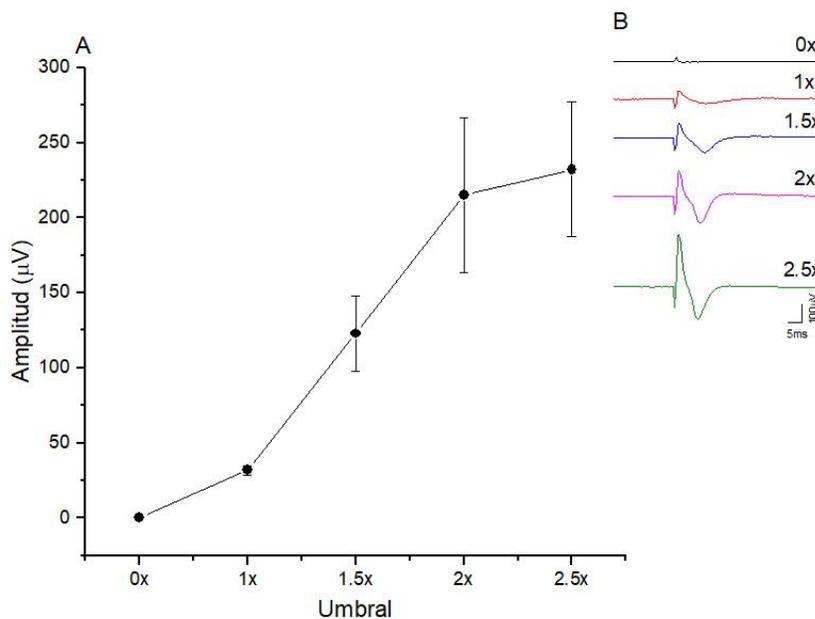


Fig. 8-Curva intensidad-amplitud.- La intensidad de estimulación necesaria para generar una respuesta sináptica se encuentra expresada en múltiplos umbral, mientras que la amplitud registrada se encuentra en orden de μV . En **A** se muestra una curva intensidad-amplitud representativa, en la que se observa la relación entre los umbrales y la amplitud generada por estos mismos, es posible

observar como al ejercer 2.5 veces umbral la respuesta evocada, alcanza su máxima amplitud y por tanto ésta comienza a saturarse. No obstante, es claro que al estimular con 1.5 veces umbral se produce la mitad de la amplitud de la respuesta sináptica evocada; siendo esta la estimulación ideal para evaluar y registrar los cambios en la actividad sináptica poblacional. En **B** se muestran trazos representativos de la curva junto con el número de veces umbral en los que fueron estimulados. (n=4, Prom \pm SE).

Por otra parte, y con la finalidad de demostrar que los cambios en la amplitud de la respuesta sináptica poblacional ante el primer estímulo (RS_{PE_1}), eran causados por los diferentes fármacos y no por inestabilidades originadas por el tiempo y/o el estado fisiológico de la rebanada (a causa de un mal desarrollo metodológico), se realizaron una serie de registros de larga duración denominados “controles largos”. Tal y como se observa en la figura 9, en la que se puede apreciar la estabilidad de la RS_{PE_1} registrada durante un periodo de 30 minutos, y ya que no

se observan variaciones significativas en la amplitud registrada, se demostró la completa viabilidad de los tejidos obtenidos para el desarrollo experimental.

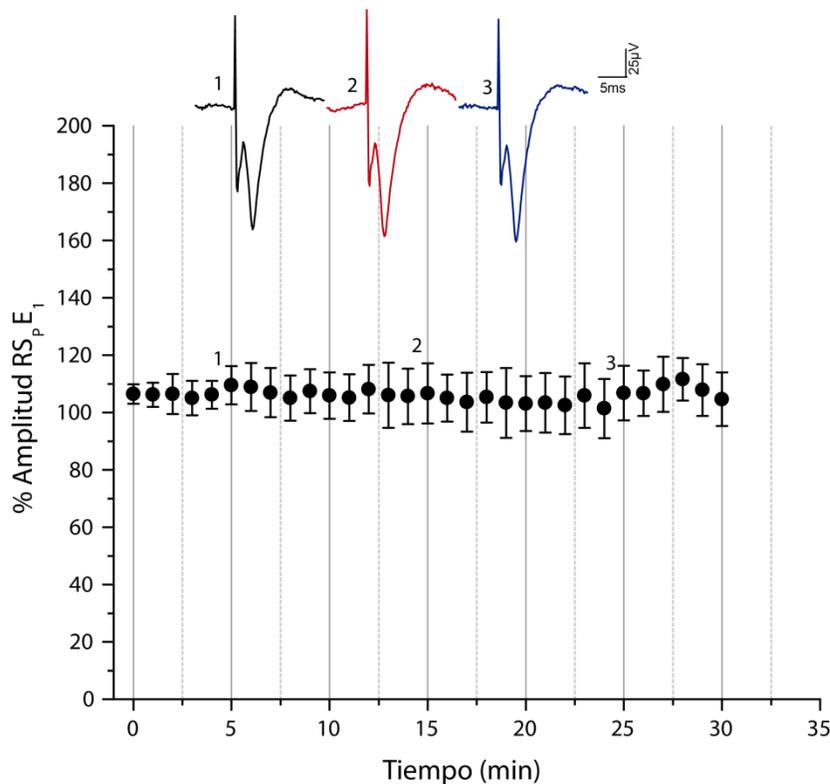


Fig. 9-Control Largo.- En **A** se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RS_PE₁ registrada durante un periodo de 30 min, observando la estabilidad de dicha respuesta durante el curso temporal. En **B** se muestran trazos representativos del curso temporal; donde los números indican la sección de registro representada. (n=3, Prom±SE).

7.1- Efecto modulador del compuesto G-1-F-2

Para observar cambios en la respuesta sináptica poblacional causados por el posible efecto modulador del compuesto G-1-F-2; se realizó el registro de la respuesta sináptica estriatal en su estado basal (control corto), para subsecuentemente agregar el compuesto G-1-F-2 de manera directa al dispensador del baño de la cámara de registro, aplicando 100µL de G-1-F-2 por cada 10ml de solución fisiológica generando así una concentración final de 10µg/ml; evitando la toxicidad neuronal reportada por Aguilar-Santamaría *et al.*, en 2007. En la figura 10 se observa el efecto del compuesto G-1-F-2 sobre el núcleo estriado, se aprecia como al agregar este compuesto se genera un incremento del 42.8% en la amplitud de la RS_PE₁ (control: 100.2286±1.3960 vs. G-1-F-2: 142.8071±1.8347); de la misma forma, los resultados del análisis estadístico ($t_{20}=22.585$ y $P<0.001$) mostraron diferencias significativas entre la actividad sináptica control y la actividad sináptica registrada durante el efecto de G-1-F-2. Por otra

parte, en la Figura 11 se presenta la relación por pulso pareado (PPR por sus siglas en inglés) de los experimentos realizados en este grupo; en esta gráfica se observa la disminución del cociente de la relación S2/S1 después de la aplicación del compuesto G-1-F-2 (control: 1.4016 ± 0.1335 vs. G-1-F-2: 1.0812 ± 0.0684); lo cual, es un indicador del aumento en la eficiencia de la transmisión sináptica, y ya que, los resultados del análisis estadístico mostraron la existencia de diferencias significativas ($t_5=4.442$ y $P=0.007$) entre la respuesta sináptica uno y la respuesta sináptica dos, se determinó que la modulación ejercida por el compuesto G-1-F-2 actúa presinápticamente.

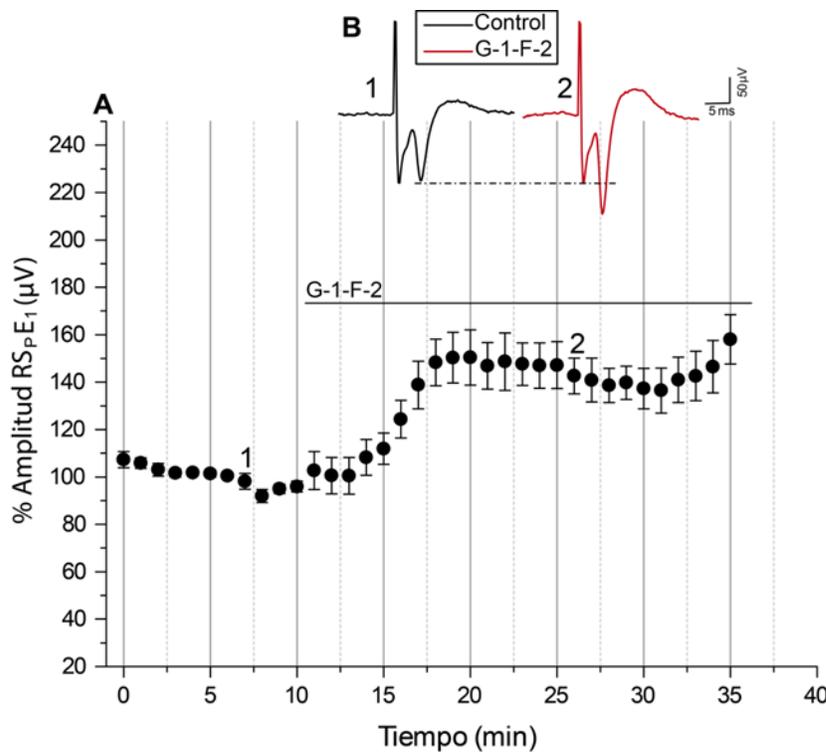


Fig. 10-Efecto moduladorio del compuesto G-1-F-2 en poblaciones neuronales estriales.-

Donde RS_{PE1} = respuesta sináptica poblacional ante el primer estímulo. En **A** se observa normalizada y en porcentaje la amplitud de la RS_{PE1} registrada durante el curso temporal (10 min de control corto y 25 min del efecto de G-1-F-2). Se observa un incremento del 40% en la amplitud registrada cuando se agrega G-1-F-2 al medio. En **B** se muestran trazos representativos del curso

temporal, donde los números indican la sección del curso representada. (n=7; Prom \pm SE).

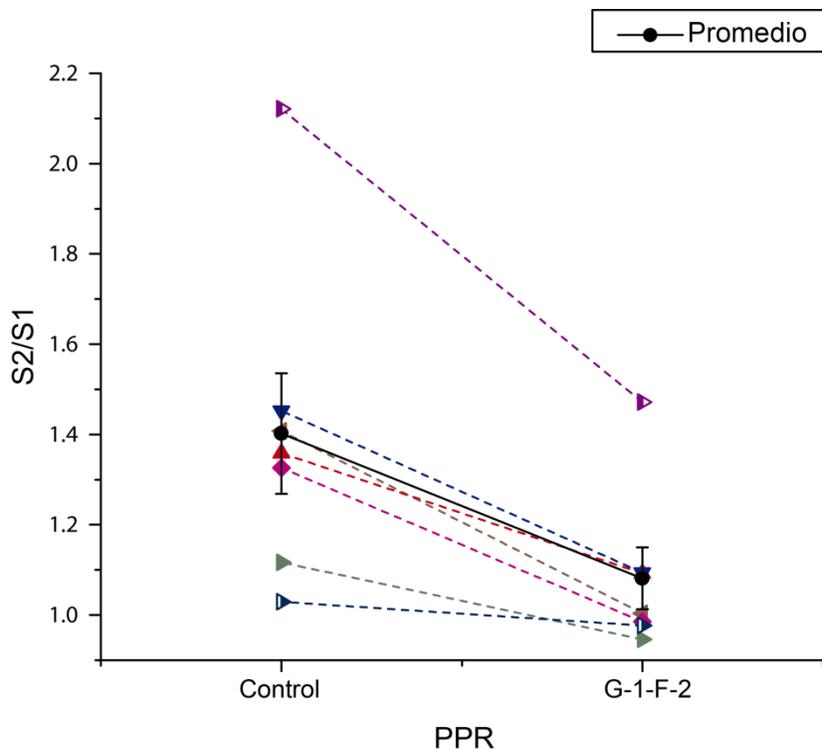


Fig. 11-Relación de pulso pareado (PPR) antes y después de la aplicación de G-1-F-2.- Cada uno de los símbolos con línea punteada representa un experimento realizado, mientras que la línea continua representa el promedio de éstos; para realizar el PPR se tomaron los últimos 10 min de registro tanto del control como del efecto de G-1-F-2. En esta figura se muestra la disminución en el cociente de la relación S2/S1 a causa de la aplicación de G-1-F-2. (n=7; Prom±SE).

7.2- Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales GABAérgicas

Confirmada la existencia de un efecto modulador ejercido por G-1-F-2 (Fig.10), se procedió a comprobar la interacción entre el compuesto G-1-F-2 y poblaciones neuronales de tipo GABAérgico, para lo cual, se realizó un “registro control” o “control corto”, subsecuentemente se agregó Bicuculina (10µM) al dispensador del baño, para posteriormente y de manera conjunta con Bicuculina aplicar el compuesto G-1-F-2 (10µg/ml), finalmente se suspendió la aplicación de Bicuculina, registrando la actividad sináptica afectada por G-1-F-2. En la figura 12 se muestra el comportamiento de la respuesta sináptica registrada; se puede apreciar el incremento del 23.6% en la amplitud de la RS_{PE_1} a causa de la interacción Bicuculina+G-1-F-2 (B+G), en comparación a la respuesta control (control: 100 ± 0.4820 vs. B+G: 123.6604 ± 0.5042), sin embargo, la amplitud registrada parece no ser afectada por la interrupción en la aplicación de Bicuculina (B+G: 123.6604 ± 0.5042 vs. G-1-F-2: 120.9833 ± 0.5740); por otra parte, los resultados del análisis estadístico ANOVA ($H_4=60.489$ y $P=<0.001$) evidenciaron la presencia de

diferencias significativas entre las condiciones; Bicuculina vs. efecto conjunto G+B implicando una posible interacción entre el compuesto G-1-F-2 y poblaciones neuronales no GABAérgicas. Por lo que, con la finalidad de observar el componente sináptico no GABAérgico afectado por G-1-F-2, se realizaron restas digitales entre las diferentes condiciones experimentales registradas; generando la diferencia entre (G+B) y (G-1-F-2); así como, la diferencia entre (Bicuculina) y (B+G), obteniendo como resultado la amplitud del componente sináptico no GABAérgico afectado por dicho compuesto (Fig.13). Finalmente, los resultados de la relación de pulso pareado, no mostraron diferencias significativas en el cambio del cociente la relación S2/S1 antes, durante y después de la aplicación de G-1-F-2, por lo que, se puede considerar que todos los efectos registrados después de la aplicación de Bicuculina son mediados postsinápticamente (Fig.14).

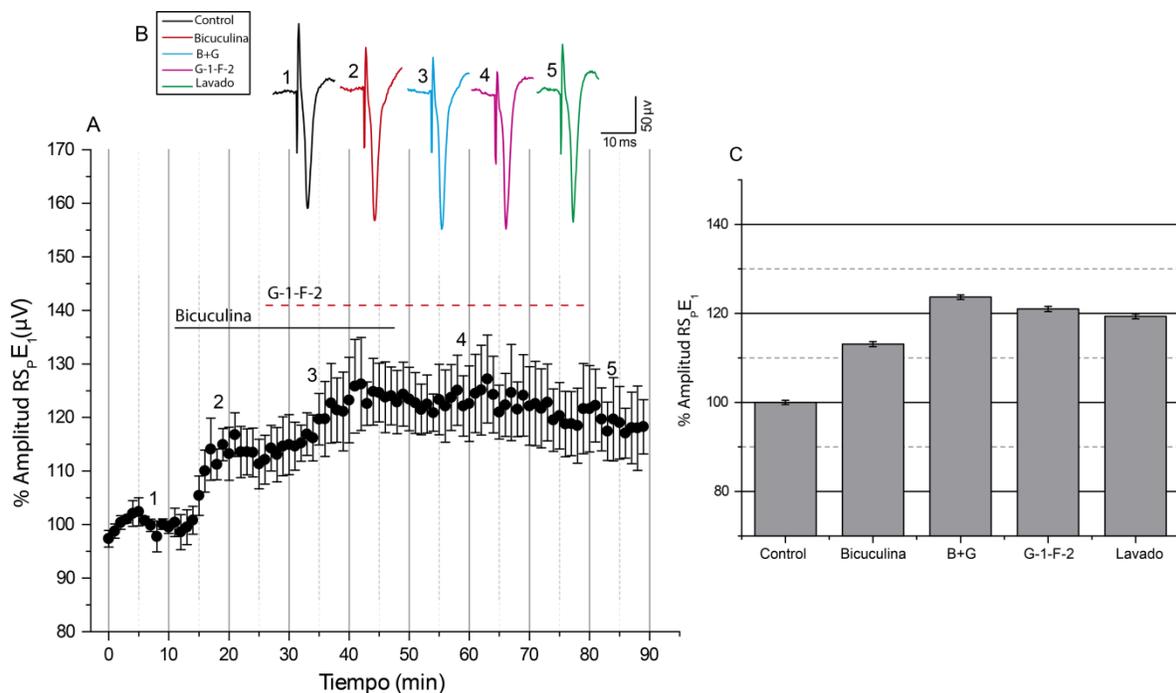


Fig. 12-Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales GABAérgicas.- Donde RS_{PE1} = Respuesta Sináptica Poblacional ante el Primer Estímulo; B+G= efecto conjunto de Bicuculina+G-1-F-2. En **A** se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RS_{PE1} registrada durante el curso temporal (10 min de control; 15 min con Bicuculina; 20 min de efecto conjunto B+G; 30 min con G-1-F-2 y 10 min de lavado). En **B** se muestran trazos representativos del curso temporal, donde los números indican la sección del curso representada. Por otra parte, **C** muestra los cambios en la RS_{PE1} registrados durante las diferentes condiciones generadas en el curso temporal. (n=6; Prom \pm SE).

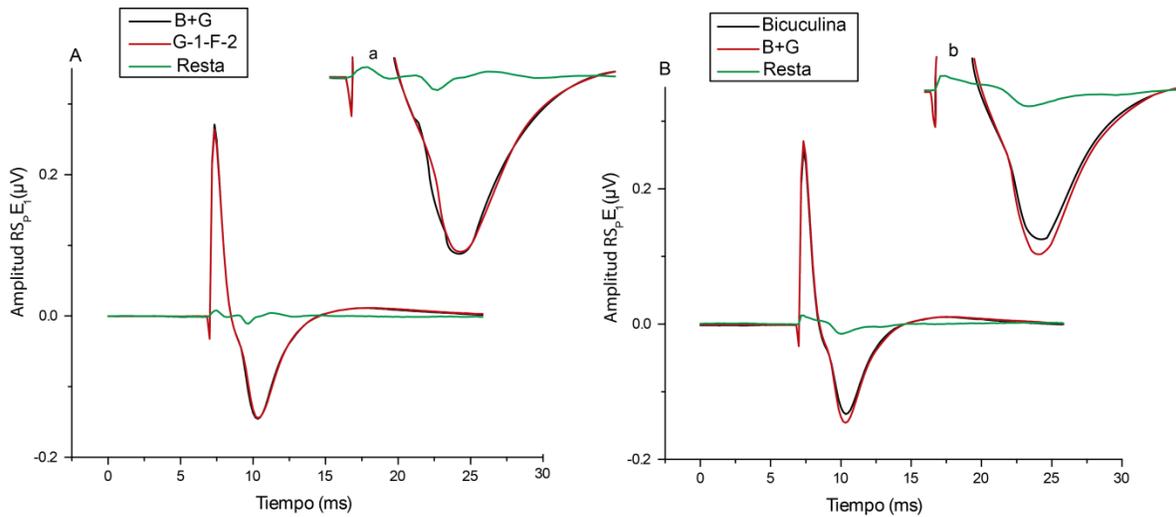


Fig. 13-Resta digital.- Donde RS_{PE_1} =Respuesta Sináptica Poblacional ante el Primer Estímulo; ms= milisegundos; B+G= efecto conjunto de Bicuculina+G-1-F-2. En **A** se observa la resta digital realizada entre el efecto producido por B+G y el producido por G-1-F-2, por otra parte, **a** (superior derecha) muestra una ampliación de **A**, en la que se observa la inexistencia de una diferencia entre estas dos condiciones. En **B** se observa la resta realizada entre el efecto producido por Bicuculina y el efecto causado por B+G, en donde se puede apreciar la presencia de una pequeña respuesta sináptica (apreciada de mejor manera en **b**) reflejando la posible existencia de un componente sináptico no GABAérgico afectados por el compuesto G-1-F-2. (n=6).

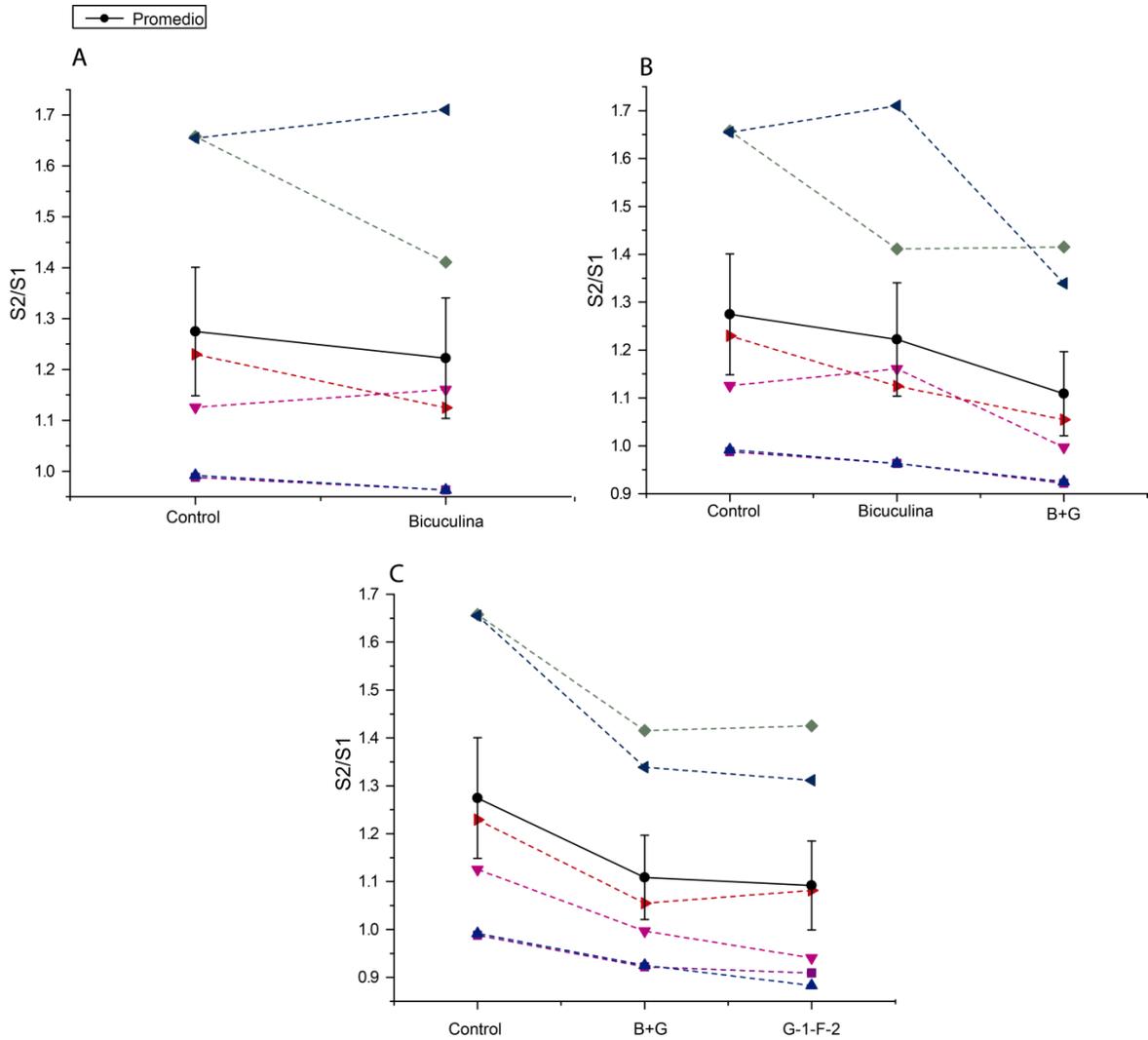


Fig. 14-Relación de pulso pareado (PPR), antes y después de la aplicación de G-1-F-2.- Cada uno de los símbolos con líneas punteadas representa un experimento realizado, mientras que la línea continua representa el promedio de éstos; en cada uno de los PPR realizados fueron tomados los últimos 10 min de registro de cada condición. En **A** se observa el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de Bicuculina ($t_5=1.160$ y $P=0.298$); por otra parte, en **B** se muestra el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de G-1-F-2 ($t_5=2.007$ y $P=0.101$); finalmente en **C** se muestra el cociente de la relación S2/S1 del efecto generado por la suspensión en la aplicación de Bicuculina ($t_5=1.320$ y $P=0.244$). Al no existir diferencias significativas entre las diferentes relaciones evaluadas, se puede considerar que los efectos producidos por el compuesto G-1-F-2 durante y después de la aplicación de Bicuculina son mediados postsinápticamente. ($n=6$; $\text{Prom} \pm \text{SE}$).

7.3- Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales no GABAérgicas

Ya que el compuesto G-1-F-2 parece estar interactuando tanto con neuronas de tipo GABAérgico como con neuronas de tipo no GABAérgico (Fig.12 y 13), se llevó a cabo la evaluación de los componentes sinápticos evocados por dicho compuesto; para lo cual, se realizó el registro de la actividad sináptica basal (control corto), posteriormente se agregó G-1-F-2 (10 μ g/ml) al dispensador del baño de la cámara de registro y subsecuentemente bajo la presencia de G-1-F-2 se agregó Bicuculina (10 μ M) al medio; finalmente se suspendió la aplicación de G-1-F-2. En la figura 15 se muestra el comportamiento de la respuesta sináptica registrada, en donde se puede apreciar un aumento del 22.1% en la amplitud de RS_{PE_1} a causa de la aplicación de G-1-F-2 (control: 100 ± 0.8131 vs. G-1-F-2: 122.1912 ± 0.6495); del mismo modo, se observa un incremento del 15.6% en la amplitud cuando se es agregada la Bicuculina (G-1-F-2: 122.1912 ± 0.6495 vs. G+B: 137.5097 ± 0.8965), lo que, en comparación al control representa un aumento del 37.5% (control: 100 ± 0.8131 vs. G+B: 137.5097 ± 0.8965); por el contrario, cuando se interrumpe la aplicación de G-1-F-2 se genera la disminución en la amplitud de la respuesta (G+B: 137.5097 ± 0.8965 vs. Bicuculina: 130.6678 ± 0.8650); no obstante, los resultados del análisis estadístico ANOVA ($H_3=56.539$ y $P=<0.001$) mostraron diferencias significativas entre las condiciones G-1-F-2 vs. G+B; y G-1-F-2 vs. Bicuculina. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el cambio del cociente de la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de Bicuculina ($t_3=0.813$ y $P=0.476$), así como, antes y después de la suspensión de G-1-F-2 ($t_3=1.938$ y $P=0.148$), considerando de esta manera, que los efectos registrados durante la interacción del compuesto G-1-F-2 con Bicuculina son mediados postsinápticamente (Fig.16). Finalmente, los resultados de la resta digital realizada entre las condiciones experimentales (G+B) y (G-1-F-2), confirmaron la existencia de un componente sináptico no GABAérgico afectado por la modulación del compuesto G-1-F-2 (Fig.17).

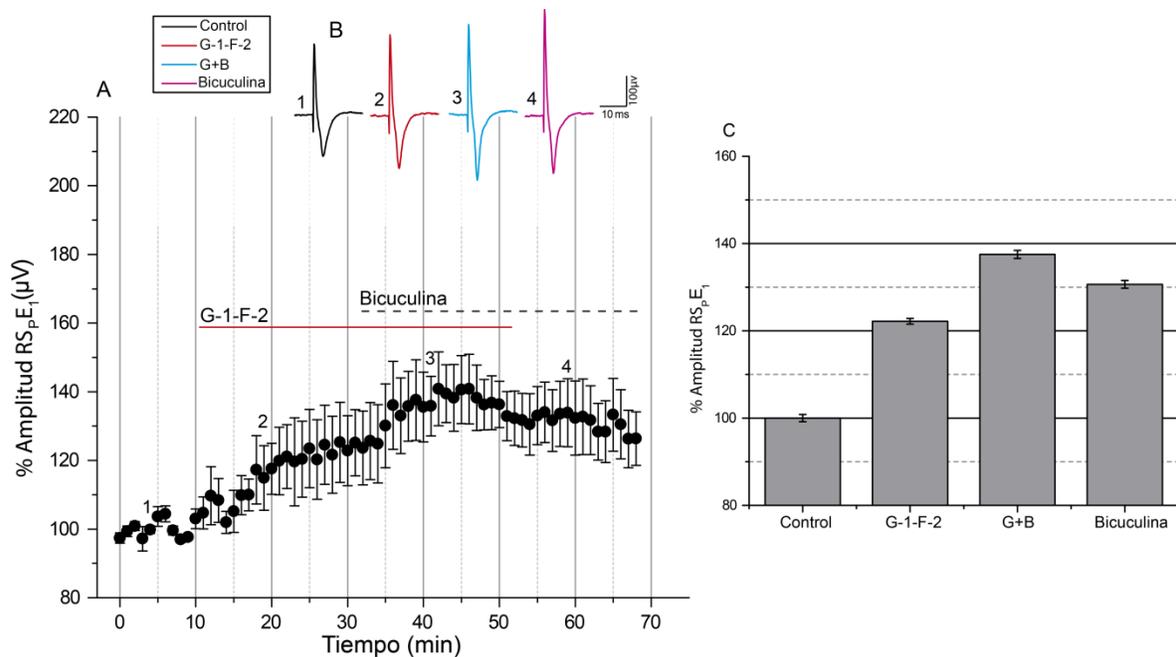


Fig. 15-Interacción del compuesto G-1-F-2 con neuronas no GABAérgicas.- Donde RS_{pE_1} = Respuesta Sináptica Poblacional ante el Primer Estímulo; G+B= efecto conjunto de G-1-F-2+Bicuculina. En **A** se observa normalizada y en porcentaje la amplitud de la RS_{pE_1} registrada durante el curso temporal (10 min de control corto, 20 min con G-1-F-2, 20 min de efecto conjunto G+B, 15 min con Bicuculina). En **B** se muestran trazos representativos del curso temporal, donde los números indican la sección del curso representada. En **C** se observan los cambios en la amplitud de la RS_{pE_1} , registrados durante las diferentes condiciones generadas en el curso temporal. (n=4; Prom \pm SE).

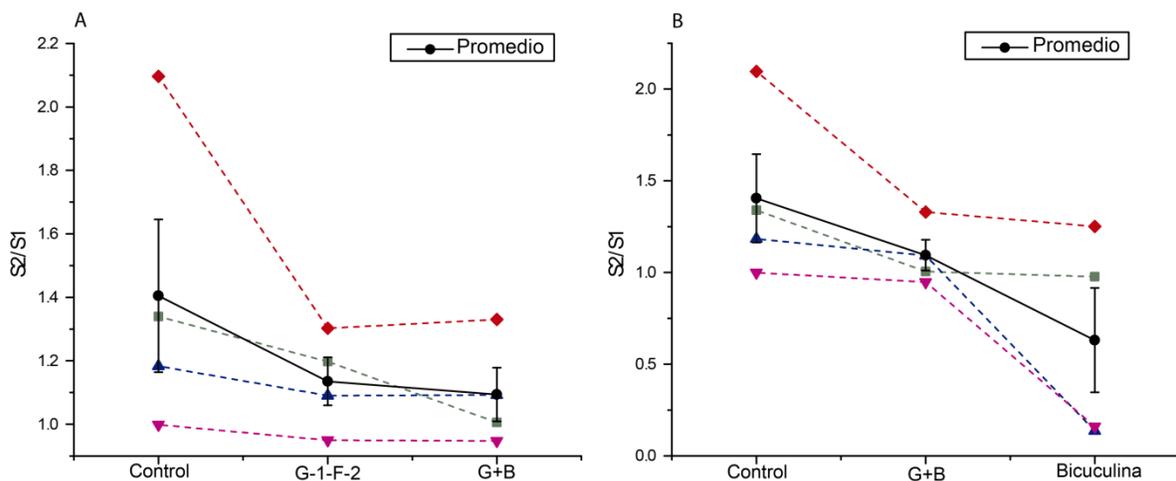


Fig. 16-Relación de pulso pareado (PPR) antes y después de la aplicación de Bicuculina.- Cada uno de los símbolos con líneas punteadas representa un experimento realizado, mientras que la línea continua representa el promedio de éstos; en cada uno de los PPR realizados se tomaron los últimos 10 min de registro de cada condición. En **A** se observa la disminución en el cociente de la relación S_2/S_1 antes y después de la aplicación de Bicuculina. En **B** se muestra la diferencia en el cociente

de la relación S2/S1 antes y después de suspender la aplicación de G-1-F-2; en ambas gráficas parece existir una diferencia en el cociente de la relación S2/S1, no obstante, los resultados estadísticos no mostraron diferencias significativas, por lo que, se supone una modulación postsináptica en ambas condiciones. (n=4; Prom±SE).

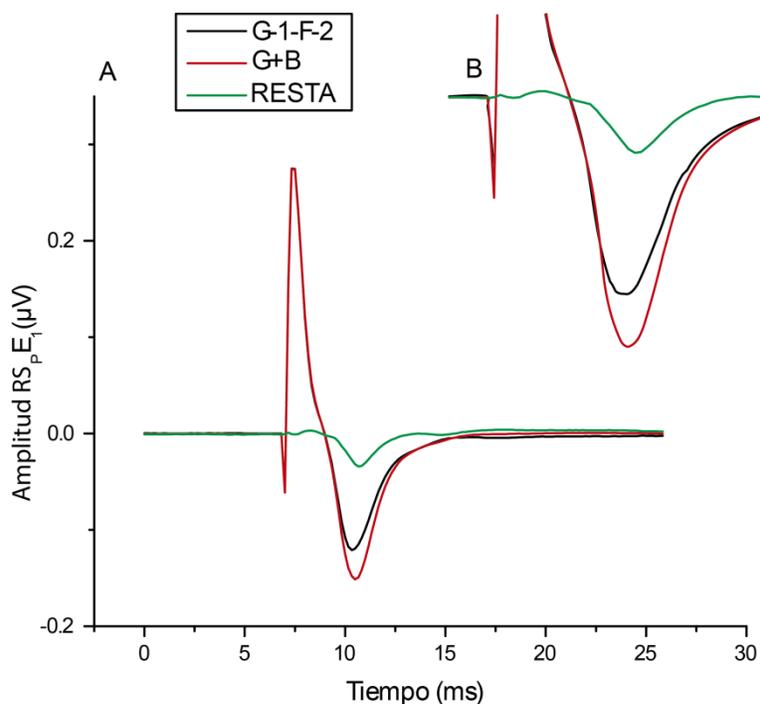


Fig. 17-Resta digital.- Donde RS_{PE1} = Respuesta Sináptica Poblacional ante el Primer Estímulo; G+B= efecto conjunto de G-1-F-2+Bicuculina; ms= milisegundos. En **A** se observa la resta digital realizada al efecto conjunto G+B menos el efecto generado por G-1-F-2, observando la amplitud del componente sináptico (azul) no GABAérgico afectado por G-1-F-2. En **B** se muestra una amplificación de **A**. (n=4).

7.4- Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales de tipo Glutamatérgico

Debido a la interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales no GABAérgicas (Figs.15 y 17), así como, a la gran cantidad de aferencias de tipo glutamatérgico que recibe el estriado, suponemos que el compuesto G-1-F-2 ejerce un efecto modulador sobre neuronas glutamatérgicas cortico-estriatales. Para corroborar dicha suposición, realizamos el registro de la actividad sináptica basal (control corto), posteriormente se agregó G-1-F-2 (10µg/ml) al dispensador del baño de la cámara de registro para consecutivamente y de manera conjunta con G-1-F-2 agregar Bicuculina al medio y finalmente en presencia del efecto conjunto G-1-F-2+Bicuculina se agregó Riluzole (10µM) al dispensador.

En la figura 18 se observa el comportamiento de la respuesta sináptica registrada, se puede apreciar un incremento del 21.6% en la amplitud de la RS_{PE1} a causa de la aplicación de G-1-F-2 (control: 100 ± 0.5301 vs. G-1-F-2: 121.6471 ± 3.5507), del

mismo modo, se observa un aumento del 30.5% en la amplitud de esta respuesta cuando se agrega Bicuculina al medio (G-1-F-2: 121.6471 ± 3.5507 vs. G+B: 152.19671 ± 2.74049); por otra parte, cuando se agrega Riluzole se genera un incremento del 17.2% (G+B: 152.19671 ± 2.74049 vs. G+B+R: 169.3638 ± 0.4077), que en comparación con el control representa un aumento del 69.3% en la amplitud registrada (control: 100 ± 0.5301 vs. G+B+R: 169.3638 ± 0.4077). Los resultados del análisis estadístico ANOVA ($H_3=65.326$ y $P=<0.001$) confirmaron la existencia de diferencias significativas entre las condiciones G-1-F-2 vs. G+B; G-1-F-2 vs. G+B+R; y G+B vs. G+B+R, implicando una interacción entre el compuesto G-1-F-2 y poblaciones neuronales no glutamatérgicas. Finalmente, la relación de pulso pareado muestra la disminución en el cociente de la relación S2/S1 antes y después de la aplicación de Riluzole, no obstante, debido a que los resultados estadísticos ($t_2=3.827$ y $P=0.062$) son muy cercanos a la significancia estadística establecida ($P=\leq 0.05$), no podemos determinar si existe o no una diferencia significativa entre la respuesta sináptica uno y la respuesta sináptica dos, por lo que tampoco podemos determinar si el efecto observado es modulado de manera presináptica o postsináptica (Fig.19).

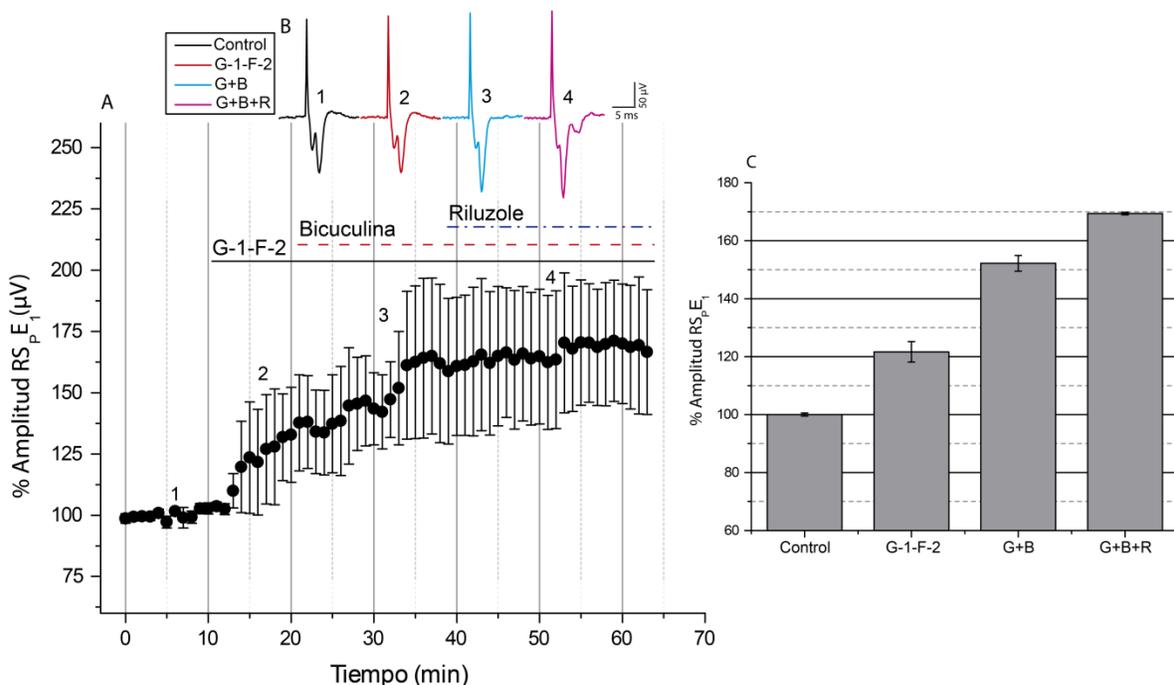


Fig. 18-Interacción del compuesto G-1-F-2 con poblaciones neuronales de tipo Glutamatergico Donde RS_pE₁= Respuesta Sináptica Poblacional ante el Primer Estímulo; G+B= efecto conjunto de

G-1-F-2+Bicuculina; G+B+R= efecto conjunto G-1-F-2+Biuculina+Riluzole. En **A** se muestra normalizada y en porcentaje la amplitud de la RS_{PE1} registrada durante el curso temporal (10min de control; 10 min con G-1-F-2; 20 min bajo G+B y 20 min bajo G+B+R). En **B** se muestran trazos representativos del curso temporal, en donde, los números indican la sección del curso representada. (n=4; Prom±SE).

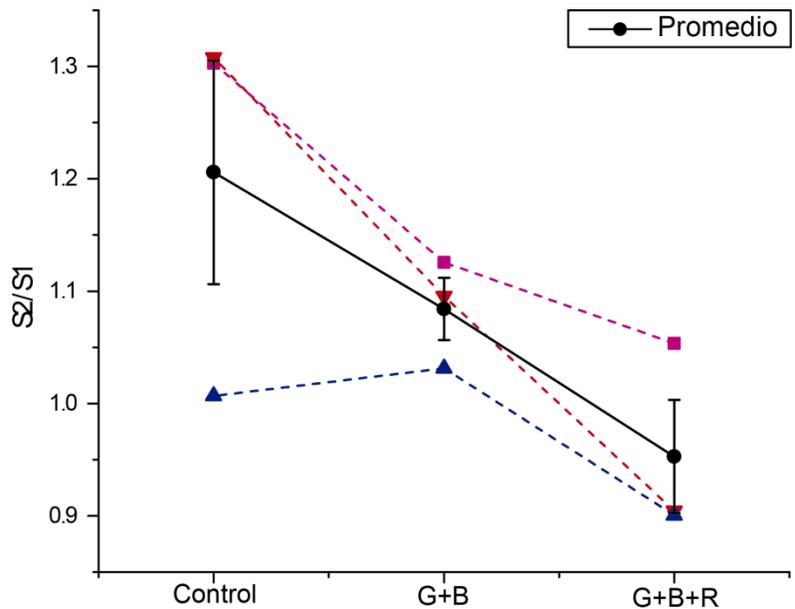


Fig. 19-Relación de pulso pareado (PPR), antes y después de la aplicación de Riluzole.- Donde G+B= efecto conjunto G-1-F-2+Bicuculina; G+B+R= efecto conjunto G-1-F-2+Bicuculina+Riluzole. Cada uno de los símbolos con líneas punteadas representa un experimento, mientras que la línea continua representa el promedio de éstos; para realizar el PPR se tomaron los últimos 10 min de registro de cada condición. En esta figura se aprecia la disminución en el

cociente de la relación $S2/S1$ antes y después de agregar Riluzole, sin embargo, debido al número de repeticiones realizadas, así como a los resultados obtenidos, no nos es posible determinar si existe o no una diferencia significativa en la respuesta sináptica antes o después de la aplicación de Riluzole (n=3; Prom±SE).

8.- DISCUSIÓN

8.1- Efecto del compuesto G-1-F-2 y su interacción con mecanismos GABAérgicos

En este trabajo se llevó a cabo la evaluación del efecto producido por el compuesto G-1-F-2 (constituido por Galphimine-B y Galphimine-A) sobre la vía cortico-estriatal. En los resultados obtenidos se observa el incremento de la actividad sináptica estriatal, debido, a la interacción de este compuesto con circuitos neuronales cortico-estriatales (Fig.10), demostrando de esta forma la existencia del efecto modulador ejercido por el compuesto G-1-F-2 sobre el núcleo estriado. Similarmente, en estudios previos se ha reportado el efecto modulador ejercido por Galphimine-B sobre la frecuencia de descarga de neuronas del área tegmental ventral (Tortoriello *et al.*, 1998; Prieto-Gómez *et al.*, 2003), así como, en la frecuencia de disparo de neuronas hipocampales (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2011); además, se tiene evidencia de la gran similitud entre el efecto sistémico generado por Galphimine-A y el producido por Diazepam (ansiolítico estándar) (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006; Avilés-Montes *et al.*, 2015), por otra parte, diversos autores han reportado la existencia del efecto ansiolítico producido por la aplicación sistémica del extracto de *G. glauca* (constituido principalmente por Galphimine-B, Galphimine-A y Galphimine-E) (Herrera-Ruiz *et al.*, 2005; Herrera-Ruiz *et al.*, 2006; Garige *et al.*, 2016). De la misma forma, pruebas clínicas evidencian la seguridad y efectividad terapéutica del uso de Galphimine-B como tratamiento en pacientes con ansiedad generalizada (Herrera-Arellano *et al.*, 2007; Herrera-Arellano *et al.*, 2011). Por lo que y en consecuencia, no es difícil suponer que las galphimines ejercen un efecto ansiolítico sobre el sistema nervioso central y si bien es cierto, que los ansiolíticos convencionales (benzodiazepinas) son fármacos que estimulan la unión del ácido γ -aminobutírico (GABA) con los receptores GABA_A, incrementando la frecuencia de apertura del canal de Cl⁻ potenciando la respuesta GABAérgica (revisado en Brunton *et al.*, 2007 y en Waldman & Terzic, 2010); se podría esperar que las galphimines (G-B y G-A) actúen de una manera similar; no obstante, al evaluar la interacción de G-1-F-2 con mecanismos GABAérgicos (mediante el bloqueo de receptores GABA_A) se

observó la posible interacción de las galphimines con mecanismos de tipo no GABAérgicos, ya que, a pesar de encontrarse bloqueados los receptores GABA_A al aplicar G-1-F-2 se registró el incremento de la respuesta sináptica estriatal (Fig.12), similarmente, al bloquear la respuesta GABAérgica en el efecto producido por el compuesto G-1-F-2, sobre poblaciones neuronales estriatales, se observó la potenciación de la respuesta sináptica evocada por dicho compuesto (Fig.15). Ahora bien, para poder explicar el comportamiento de los datos expuestos es necesario considerar que la respuesta sináptica poblacional registrada, es en sí, la suma de las interacciones y conexiones intrínsecas de los circuitos cortico-estriatales, por lo que, es altamente probable que el efecto del compuesto G-1-F-2 evoque el incremento de aferencias glutamatérgicas proyectadas desde la corteza hacia el estriado, generando el aumento en la liberación de GABA y por tanto el incremento en la actividad sináptica estriatal registrada (Fig.10). No obstante, ya que al bloquear los receptores GABA_A se observó la presencia de un discreto componente sináptico aparentemente no GABAérgico, afectado por el efecto del compuesto G-1-F-2 (Fig.12 y 15); existe la probabilidad de que las galphimines (G-B y G-A) no se encuentren interactuando de manera directa con mecanismos GABAérgicos, coincidiendo con lo propuesto por Prieto-Gómez *et al.* (2003) y Avilés-Montes *et al.* (2015). En contraste, al realizar el análisis de la relación por pulso pareado, observamos como en la ausencia de Bicuculina el efecto ejercido por el compuesto G-1-F-2 (Fig.11) se encuentra modulado por mecanismos presinápticos, por el contrario, al evaluar el efecto de la interacción de G-1-F-2 con Bicuculina se encontró que la modulación de dicho efecto, se lleva a cabo mediante mecanismos de tipo postsinápticos (Fig.16); evidenciando de esta forma, la posibilidad de que las galphimines se encuentren interactuando sobre diferentes tipos de receptores, como receptores GABAérgicos no sensibles a Bicuculina, receptores de tipo NMDA o bien sobre transportadores de glutamato.

Por otra parte, con base en los reportes de la selectividad que presenta Galphimine-B sobre neuronas dopaminérgicas (Tortoriello *et al.*, 1998; Prieto-Gómez *et al.*, 2003) y considerando que las espinosas medianas reciben

aferencias dopaminérgicas mesencefálicas, al igual que también expresan receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ (revisado en Waldman & Terzic, 2010; Gómez-Chavarín *et al.*, 2014), no podemos ignorar la probabilidad de que la respuesta evocada por la acción del efecto del compuesto G-1-F-2, se encuentre mediada por el bloqueo directo de circuitos dopaminérgicos mesencefálicos, que de ser este el caso, incrementaría la actividad de las neuronas de proyección GABAérgica provocando la inhibición de los circuitos de los ganglios basales y a su vez incitando un efecto ansiolítico sistémico.

8.2- Interacción del compuesto G-1-F-2 con mecanismos glutamatérgicos

A causa de los resultados previamente expuestos y a la posible interacción de las galphimines con mecanismos no GABAérgicos (Fig.15), en la segunda parte de este trabajo, llevamos a cabo la evaluación de la posible interacción entre el compuesto G-1-F-2 y mecanismos de tipo glutamatérgicos. En los resultados obtenidos observamos cómo la aplicación de Riluzole incrementa la amplitud de la respuesta sináptica evocada por el efecto conjunto de G-1-F-2+Bicuculina, es decir, a pesar de bloquear la respuesta rápida GABAérgica e inhibir la liberación de glutamato y en consecuencia reducir la excitabilidad neuronal, se sigue registrando el incremento de la respuesta sináptica poblacional (Fig.18), lo que en primera instancia implicaría el hecho de que las galphimines (G-B y G-A) no interactúan con mecanismos glutamatérgicos.

Para poder explicar este comportamiento es importante considerar, que, pese a que se sabe que el Riluzole es un fármaco que puede inhibir la liberación de glutamato, aún se desconoce el mecanismo su mecanismo de acción; y dado que se ha propuesto que dicho mecanismo podría ser efectuado mediante el antagonismo de los receptores a glutamato, la promoción en la movilización de Ca⁺, el bloqueo directo de canales de potasio dependientes de voltaje o mediante su interacción con transportadores de glutamato (Cheramy *et al.*, 1992; Harriet *et al.*, 1996; Kretschmer *et al.*, 1998; Albo *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2008), así como, a los experimentos realizados tanto en modelos animales como en pruebas clínicas, en los que se exponen las propiedades ansiolíticas y antidepresivas ocasionadas

por la aplicación de Riluzole (Pittenger *et al.*, 2008; Gourley *et al.*, 2012; Sugiyama *et al.*, 2012; Salardini *et al.*, 2016). Es posible inferir que quizá las galphimines se encuentren compitiendo con el efecto ansiolítico producido por este fármaco, o bien, la interacción de las galphimines con Riluzole pueda tanto potenciar el efecto modulador ejercido por el compuesto G-1-F-2, como, inversamente potenciar el efecto ansiolítico generado por el Riluzole.

Por otra parte, si consideramos que la activación de los receptores NMDA depende de la unión simultánea tanto de glutamato como de glicina (Brunton *et al.*, 2007; Flores-Soto *et al.*, 2012), y que la aplicación de bajas concentraciones de Riluzole inhiben la liberación de glutamato, existe la probabilidad de que las galphimines (G-B y G-A) modulen la activación de los receptores NMDA mediante su interacción con glicina; del mismo modo, los resultados obtenidos por Avilés-Montes (2015), sugieren que la actividad ejercida por las galphimines se debe a un efecto antagonista sobre los receptores NMDA. Tampoco podemos omitir la posibilidad de que las galphimines actúen mediante el bloqueo de los mecanismos de recaptura de glutamato, uniéndose a los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT-1 y EAAT-2) provocando la permanencia de glutamato en el espacio sináptico, incrementando a su vez la probabilidad de unión del neurotransmisor con receptores membranales y por tanto evocando el aumento en la respuesta sináptica excitatoria; sin embargo, es preciso mencionar que no hay evidencia experimental que sustente estas conjeturas, que bien podrían o no ayudar a explicar los circuitos neuronales involucrados en el mecanismo de acción del compuesto G-1-F-2.

En conclusión, aunque con los resultados obtenidos en este trabajo se ayudó a esclarecer la existencia del efecto modulador ejercido por el compuesto G-1-F-2, la cantidad de datos obtenidos no son los suficientes como para determinar tanto el mecanismo de acción de las Galphimines, así como, los circuitos neuronales involucrados en éste.

9.- CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos se comprobó que el compuesto denominado “G-1-F-2”, conformado por Galphimine-B y Galphimine-A; ejerce un efecto modulador sobre circuitos cortico-estriatales y de acuerdo a los datos obtenidos mediante el análisis de PPR, concluimos que dicha modulación es efectuada de manera presináptica.
- Aunque en la literatura se sugiere que las Galphimines (G-B y G-A) no interactúan directamente con mecanismos de tipo GABAérgico, debido a la cantidad de datos obtenidos, así como a la naturaleza de nuestros experimentos, no podemos confirmar o negar esta suposición, así como, tampoco podemos confirmar la posible interacción de estas moléculas con mecanismos de glutamatérgicos.
- Finalmente, los datos obtenidos en este trabajo no son los suficientes como para determinar tanto el mecanismo de acción, así como, los circuitos neuronales afectados por el efecto modulador ejercido por el compuesto G-1-F-2.

10.- LITERATURA CITADA

- ❖ Abarca, V, R., Zamilpa, A., Alarcón, A, F., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E. (2014). Pharmacokinetic Study in Mice of Galphimine-A, an Anxiolytic Compound from *Galphimia glauca*. *Molecules*, 19, 3120-3134.
- ❖ Afifi, k, A & Bergman, A, R. (2006). NEUROANATOMÍA FUNCIONAL: texto y atlas (segunda edición). México. McGraw-Hill Interamericana.
- ❖ Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Jiménez, J. E., Alonso-Cortés, D., Cortés-Gutiérrez, E., Ledesma, N., Tortoriello, J. (2007). Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 35–40.
- ❖ Albo, F., Pieri, M., Zona, C. (2004). Modulation of AMPA Receptors in Spinal Motor Neurons by the Neuroprotective Agent Riluzole. *Journal of Neuroscience Research*, 78, 200–207.
- ❖ Álvarez, González, E., Álvarez, González, L., Macías, Gonzáles, R., Pavón, Fuentes, N. (2001). Conceptos Actuales sobre la Función de los Ganglios Basales y el papel del Núcleo Subtalámico (NST) en trastornos del movimiento. *Revista mexicana de Neurociencia*, 2(2), 77-85.
- ❖ Ávila-Luna, A. & Bueno-Nava, A. (2014). Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. INVESTIGACION en DISCAPACIDAD, 3(1), 19-24.
- ❖ Avilés-Montes, D. (2015). Interacción de Galphimina-A con los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos, en modelos de ansiedad y electrofisiología de la amígdala basolateral. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias biológicas y de la salud. División de ciencias biológicas y de la salud, unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- ❖ Avilés-Montes, D., Herrera-Ruiz, M., Román-Ramos, R., Jiménez-Ferrer, E., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Tortoriello, J. (2015). Pharmacological interaction between galphimine-A, a natural anxiolytic compound and gabaergic drugs. *International Journal of Pharmacology*, 11(8), 944–955.

- ❖ Bargas, J. & Galarraga, E. (2000). La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. *Ciencia al Día Internacional*, 3(2).
- ❖ Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana^A. UNAM. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=1&t=nervios> el día 9 de Enero del 2018.
- ❖ Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana^B. UNAM. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7001> el día 26/02/18.
- ❖ Bolam, P, J., Brown, C, T, M., Moss, J., Magil, J, P. (2009). Basal Ganglia: Internal Organization. *Encyclopedia of Neuroscience*, 2, 97-104.
- ❖ Brunton, I., Lazo, J., Parker, K. (2007). GOODMAN & GILMAN LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA (Undécima edición). Colombia. McGRAW-HILL INTERAMERICANA. 429-459.
- ❖ Cardoso-Taketa, A. T., Pereda-Miranda, R., Young, H. C., Verpoorte, R., Villarreal, M. L. (2008). Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Planta Medica*, 74(10), 1295–1301.
- ❖ Cepeda, C., Hurst, R., Calvert, C., Hernández-Echeagaray, E., Nguyen, O., Jocoy, E., Christian, L., Ariano, M., Levine, M. (2003). Transient and Progressive Electrophysiological Alterations in the Corticostriatal Pathway in a Mouse Model of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 23(3):961–969.
- ❖ Cepeda, C., Hurst, Raymond, S., Calvert, Christopher, R., Hernández-Echeagaray, Nguyen, Oanh, K., Jocoy, E., Christian, Lindsey, J., Ariano, Marjorie, A., Levine, Michael, S. (2003). Transient and Progressive Electrophysiological Alterations in the Corticostriatal Pathway in a Mouse Model of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 23(3):961–969.

- ❖ Challenger, A. & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres. *Capital Natural de México, Vol. I: Conocimiento Actual de La Biodiversidad, I*, 87–108.
- ❖ Cheramy, A., Barbeito, L., Godeheu, G., Glowinski, J. (1992). Riluzole inhibits the release of glutamate in the caudate nucleus of the cat in vivo. *Neuroscience Letters*, 147, 209-212.
- ❖ Colino, A., Muños, J., Vara, H. (2002). Plasticidad sináptica a corto plazo. *Revista de NEUROLOGÍA*. 34(6). 593-599
- ❖ Crittenden, R, J. & Graybiel, M. (2011). Basal ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 59 p.
- ❖ Do, J., Kim, J. I., Bakes, J., Lee, K., Kaang, B. K. (2013). Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. *Learning & memory*, 20(1), 21-28.
- ❖ Fanjul de Moles, M, L. & Hiriart, Urdanivia, M. (Eds). (2008). *BIOLOGÍA FUNCIONAL DE LOS ANIMALES II. Una neurofisiología comparada (Segunda edición)*. México D.F. Siglo XXI. 117-121.
- ❖ Flores-Soto, M., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vázquez-Valls, E., Gónzales-Castañeda, R., Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301-310.
- ❖ Garige, B., Keshetti, S., Vattikuti, U. (2016). In vivo Study on Depressant Effects and Muscle Coordination Activity of *Galphimia glauca* Stem Methanol Extract. *Pharmacognosy Research*. 8(4), 219–225.
- ❖ Gómez-Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México/Medicinal plants in a small village in the state of Tabasco México. *Revista Fitotecnía Mexicana*, 35(1), 43–49.
- ❖ Gómez-Chavarín, M., Santos-Echeverria, R., García-García, M., Torner-Aguilar, C., Báez-Saldaña, A. (2014). Desarrollo de la vía dopaminérgica nigroestriatal. *Arch Neurocién (Mex) INNN*, 19(2), 95-103.

- ❖ González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Marquina, S., Álvarez, L., Tortoriello, J. (2014). Anti-inflammatory activity and chemical profile of galphimia glauca. *Planta Medica*, 80(1), 90–96.
- ❖ Gourley, L. S., Espitia, J. W., Sanacora, G., Taylor, J. R. (2012). Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. *Psychopharmacology*, 219, 805–814.
- ❖ Guzmán, G. L., Reyes, C. R., Bonilla, J. H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 591-608.
- ❖ Harriet, M., Fulton, B., Benfield, P. (1996). Riluzole A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and herapeutic Potential in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Drugs*, 52(4), 549-563.
- ❖ Herrera-Arellano, A., Jiménez-Ferrer, J., Zamilpa, A., García-Alonso, G. (2011). Therapeutic Effectiveness of Galphimia glauca vs. Lorazepam in Generalized Anxiety Disorder. A Controlled 15-Week Clinical Trial. *Planta Medica*, 78, 1529–1535.
- ❖ Herrera-Arellano, A., Jiménez-Ferrer, J., Zamilpa, A., Morales-Valdéz, M., García-Valencia, C., Tortoriello, J. (2007). Efficacy and Tolerability of a Standardized Herbal Product from *Galphimia glauca* on Generalized Anxiety Disorder. A Randomized, Doble-Blind Clinical Trial Controlled with Lorazepam. *Planta Medica*, 73, 713-717.
- ❖ Herrera-Ruiz, M., González-Cortázar, M., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Alvares, L., Ramírez, G., Tortoriello, J. (2005). Anxiolytic Effect of Natural Galphimines from Galphimia glauca and their Chemical. *Journal of Natural Products*, 69 (1).
- ❖ Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., De Lima, T., Avilés-Montes, D., Pérez-García, D., González-Cortázar, M., Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from Galphimia glauca. *Phytomedicine*, 13, 23–28.

- ❖ Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, J. E., De Lima, T. C. M., Avilés-Montes, D., Pérez-García, D., González-Cortazar, M., Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine*, 13(1–2), 23–28.
- ❖ Herrero, T, M., Luquin, M, R., Vicente de Pabos, M., Villalba, F, E. “Capítulo.1. Anatomía química de los ganglios basales. La transmisión dinámica”. En Micheli, E, F., Luquin, Pulido, R, M. (2012). *Movimientos Anormales. Clínica y terapéutica*. España, Medica Panamericana.
- ❖ INEGI. (2016). Estadísticas a propósito del día internacional de los pueblos indígenas. Recuperado de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/indigenas2016_0.pdf el día 15/octubre/17.
- ❖ Jahn, K., Schlesinger, F., Jin, L, J., Dengler, R., Bufler, J., Krampfl, K. (2008). Molecular mechanisms of interaction between the neuroprotective substance Riluzole and GABAA-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*, 378, 53–63.
- ❖ Jiménez-Ferrer, E., Herrera-Ruiz, M., Ramírez-García, R., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J. (2011). Interaction of the natural anxiolytic Galphimine-B with serotonergic drugs on dorsal hippocampus in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 724–729.
- ❖ Jiménez-Ferrer, E., Herrera-Ruiz, M., Ramírez-García, R., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J. (2011). Interaction of the natural anxiolytic Galphimine-B with serotonergic drugs on dorsal hippocampus in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 724– 729.
- ❖ Johnston, D & Miao-Sin, W, S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. Cambridge: MIT press. 392-395.
- ❖ Kreitzer, C, A. & Malenka, C, R. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, 60(4), 543-554.
- ❖ Kretschmer, B., Kratzer, U., Schmidt, W. (1998). Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*, 358, 181–190.

- ❖ Langley, L. L., Telford, R., Christensen, B. J. (1981). Anatomía y Fisiología (cuarta edición). México D.F. Interamericana.
- ❖ Lara-Ochoa, F., Guillén-Torres, A., Espinosa-Pérez, G., Ortega-Hernández, A. (2005). Conformational study of galphimines A and B. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(11–12), 2677–2686.
- ❖ Lewis, G. J. S., Caldwell, A., Barker, A. R. (2003). Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(10), 1-20.
- ❖ Loraine, S. & Mendoza-Espinoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México/Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18–27.
- ❖ Mendoza, Duarte, E. (2001). MODULACION PRESINAPTICA DE LAS AFERENTES GLUTAMATERGICAS NEOESTRIATALES POR LA ACTIVACION DE RECEPTORES A OPIACEOS μ Y δ . Tesis para obtener el título de Biólogo. Escuela Nacional de estudios Profesionales Campus Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- ❖ Mendoza, E., Miranda-Barrientos, J. A., Vázquez-Roque, R. A., Morales-Herrera, E., Ruelas, A., De la Rosa, G., Flores, G., Hernández-Echeagaray, E. (2014). In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience*, 280, 156–170.
- ❖ Morán, Martínez, I. (2013). PARTICIPACIÓN DE LAS NEUROTROFINAS BDNF Y NT-4/5 EN LA MODULACIÓN DE LA COMUNICACIÓN SINÁPTICA CORTICO-ESTRIATAL, Tesis que para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México.
- ❖ Ortiz-Caltempa, A. (2008). Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimina glauca* en suspensión para la producción de triterpenos, Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias en desarrollo

de productos bióticos. Centro de desarrollo de productos bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec Morelos, México.

- ❖ Pérez, O, G, & González, M., (2015). Plantas medicinales contra la ansiedad. *Ciencia*, julio-septiembre 2015, 53-307.
- ❖ Pittenger, C., Coric, V., Banasr, M., Bloch, M., Krystal, H, J., Sanacora, G. (2008). Riluzole in the Treatment of Mood and Anxiety Disorders. *CNS Drugs*, 22(9), 761-786.
- ❖ Prieto-Gómez, B., Tortoriello, J., Vázquez-Alvarez, A., Reyes-Vázquez, C. (2003). Galphimine B modulates synaptic transmission on dopaminergic ventral tegmental area neurons. *Planta Medica*, 69(1), 38–43.
- ❖ Purves, D., Augustine, J, G., Fitzpatrick, D., Hall, C, W., LaMantia, Anthony-Samuel., White, E, L. (2015). *NEUROCIENCIAS* (quinta edición). España. Medica Panamericana.
- ❖ Quiroz, Gutiérrez, F. (2012). *Tratado de Anatomía Humana, Tomo II* (Cuadragésima tercera edición). México. Editorial PORRUA.
- ❖ Salardini, E., Zeinoddini, A., Mohammadinejad, P., Khodaie-Ardakani, M, R., Zahraei, N., Zeinoddini, A., Akhondzadeh, S. (2016). Riluzole combination therapy for moderate-to-severe major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Psychiatric Research*, 75, 24-30.
- ❖ Sandoval, Romero, A (ed). (2016). *SISTEMA NERVIOSO HUMANO*. México. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- ❖ Sharma, A., Luis Folch, J., Cardoso-Taketa, A., Lorence, A., Luisa Villarreal, M. (2012). DNA barcoding of the Mexican sedative and anxiolytic plant *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(2), 371–378.
- ❖ Silva, Pereyra, Juan. (2011). *Métodos en neurociencias cognitivas*. México. Editorial El Manual Moderno. 2-19.
- ❖ Snell, S, R. (2006). *Neuroanatomía Clínica* (sexta edición). Buenos Aires. Medica Panamericana.

- ❖ Sugiyama, A., Saitoh, A., Iwai, T., Takahashi, K., Yamada, M., Sasaki-Hamada, S., Oka, Jun-Ichiro., Inagaki, M., Yamada, M. (2012). Riluzole produces distinct anxiolytic-like effects in rats without the adverse effects associated with benzodiazepines. *Neuropharmacology*, 62, 2489-2498.
- ❖ Tepper, J. M. & Plenz, D. (2006). Microcircuits in the striatum: striatal cell types and their interaction. In Grillner, S. et al. *Microcircuits: The Interface Between Neurons and Global Brain Function (Dahlem Workshop Report)*, 127-135.
- ❖ Tortoriello, J. & Lozoya, X. (1992). Effect of *Galphimia glauca* methanolic extract on neuropharmacological tests. *Planta Medica*, 58(3), 234–236.
- ❖ Tortoriello, J. (1991). ESTUDIO FITOQUIMICO Y FARMACOLÓGICO DE Galphimia glauca Cav. Tesis para la obtención del grado Maestría en ciencias. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Xochitepec, Morelos, México.
- ❖ Tortoriello, J., Herrera-arellano, A., Herrera-ruiz, M. L., Rojas-bribiesca, G., Zamilpa, A. (2006). Aplicación clínica de un ansiolítico obtenido de *Galphimia glauca*. *Revista de Fitoterapia*, 6, 1–4.
- ❖ Tortoriello, J., Herrera-Arellano, A., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., González, M., Jiménez Ferrer, E. (2011). New anxiolytic phytopharmaceutical elaborated with the standardized extract of *Galphimia glauca*. *Planta Medica*, 78(11).
- ❖ Tortoriello, J., Ortega, A., Herrera-Ruiz, M., Trujillo, J., Reyes-Vázquez, C. (1998). Galphimine-B Modifies Electrical Activity of Ventral Tegmental Area Neurons in Rats. *Planta Medica*, 64, 309—313.
- ❖ Toscano, A., Ortega, A., Maldonado, E., Gaviño, R., Lozoya, X., Tortoriello, J. (1993). Structure of galphimine B. *Acta Crystallographica Section C*, 49(4), 774–776.
- ❖ Urbani, A. & Belluzzi, O. (2000). Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12, 3567-3574.

- ❖ Vargas, R, A., Zamilpa, A., Aguilar, F. A., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E. (2014). Pharmacokinetic study in mice of Galphimine-a, an anxiolytic compound from *Galphimia glauca*. *Molecules*, 19(3), 3120–3134.
- ❖ Waldman, S. & Terzic, A. (2010). Farmacología y terapéutica: Principios para la práctica. México. Editorial El Manual Moderno. 96-107.
- ❖ Waxman, G, S. (2011). NEUROANATOMÍA CLÍNICA (Vigésimo sexta edición). México D.F. McGraw-Hill.