



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad De Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación preclínica del efecto ansiolítico y anticonvulsivo de
Sargassum fluitans y *Sargassum buxifolium*

T E S I S

Que para obtener el título de

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:

Gil López Susana Alejandra

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Myrna Déciga Campos



Ciudad de México,

Mayo, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la

Dra. Myrna Déciga Campos

Investigador Titular B de la Sección de Estudios de Posgrado e
Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto
Politécnico Nacional.

El presente trabajo fue apoyado por la **Secretaría de Investigación de Posgrado del IPN**
en el proyecto SIP-20196843.

Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.

Marie Curie

A mis padres, Raúl y Magdalena

A mis abuelos, Bernardo y Martha

*A la Dra. Myrna Déciga, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su dirección, por la fortuna que he tenido de coincidir con ella y por permitirme conocer a la persona extraordinaria que hay más allá del trabajo de laboratorio, completo agradecimiento por su estima, paciencia, confianza en mí y en mi trabajo, el apoyo incondicional, los conocimientos, por guiarme y por todas las facilidades brindadas.
Con toda mi admiración, respeto y cariño.*

A mis asesoras y comité sinodal por su disposición y asesoría en el proyecto.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

*A los profesores y amigos que estuvieron presentes
a lo largo de mi estancia en la facultad.*

A mis profesoras de Farmacia Clínica.

A Bernardo y Martha, por haber sido mis maestros, un ejemplo de vida y mucho más que unos abuelos para mí, hasta el cielo.

*A mis padres, Raúl y Magdalena, por ser un ejemplo de dedicación, persistencia, fortaleza y sabiduría, por inspirarme, guiarme e impulsarme a perseguir mis sueños y brindarme a
manos llenas todo su amor y apoyo.*

*A ti, Paola, por lo bonito que es ser tu hermana, por ser mi mejor amiga y confidente, por apoyarme y
creer en mí, siempre estaré para ti.*

A mi familia, especialmente a Berna, Isa, Lilia, Lucero, Vale, Ale, gracias por estar pendientes y presentes en mi vida.

A David, porque encontré en ti mucho más que amor, siempre un abrazo, palabras de aliento, apoyo y compañía a lo largo de toda esta aventura, por hacerla más liviana, gracias.

A Rogelio, Paco, Pepe, Gaby, por acompañarme a lo largo de tantos años, por ser esos amigos que se convirtieron en hermanos y siempre estar, no importando la distancia.

A mis compañeros y sobre todo amigos; Mich, Ale, Jou, Abraham, Eber, por los infinitos recuerdos, la amistad y todas las gratas experiencias, sin ustedes la Facultad no hubiese sido la misma.

A mis compañeros y amigos de Farmacia Clínica.

A Boris, Bobby y Yakko, por acompañarme en cada desvelo.

A los omitidos sin razón alguna, me disculpo. ¡Gracias!

Los quiere infinitamente, Susana



I. Índice general

I. Índice general.....	i
II. Índice de figuras.....	iii
III. Índice de tablas.....	iii
IV. Índice de diagramas.....	iii
V. Notaciones empleadas.....	iv
VI. Resumen.....	v
VII. Introducción.....	vi
1 Antecedentes	1
1.1 Desarrollo de fármacos.....	1
1.2 El Sargazo.....	3
1.3 Usos del Sargazo.....	4
1.4 Utilidad del Sargazo en la actividad biológica.....	5
1.5 Utilidad del Sargazo en la agricultura.....	6
1.6 Utilidad del Sargazo en la industria cosmética	7
1.7 Utilidad del Sargazo como alimento.....	7
1.8 Investigación del Sargazo en México.....	9
1.9 Generalidades de la ansiedad.....	10
1.10 Generalidades de la epilepsia	14
2 Planteamiento del problema	21
3 Hipótesis.....	21
4 Objetivos.....	21
4.1 Objetivos general.....	21
4.2 Objetivos específicos.....	22
5 Metodología.....	22
5.1 Material biológico.....	22
5.1.1 Colecta y clasificación de especies de <i>Sargassum</i>	22



5.1.2	Preparación de los extractos.....	22
5.2	Fármacos y reactivos.....	23
5.3	Animales	23
5.4	Bioensayo en <i>Artemia salina</i>	23
5.5	Pruebas de conducta exploratoria.....	26
5.5.1	Prueba de campo abierto	26
5.5.2	Prueba de tablero perforado	26
5.5.3	Prueba del cilindro de exploración	27
5.5.4	Diseño experimental de las pruebas de conducta exploratoria.....	28
5.6	Evaluación de la actividad sedante-hipnótica	29
5.7	Evaluación de la actividad anticonvulsiva	30
5.8	Análisis de Resultados	32
5.8.1	Cálculo de la CL ₅₀ por el método Probit.....	32
5.8.2	Análisis de pruebas conductuales.....	35
6	Resultados.....	35
6.1	Bioensayo de <i>Artemia salina</i>	35
6.2	Evaluación de la actividad motora.....	35
6.2.1	Prueba de campo abierto	35
6.2.2	Levantamientos en caja de exploración.....	36
6.2.3	Prueba de tablero perforado	36
6.2.4	Prueba del cilindro de exploración	37
6.3	Evaluación de la actividad anticonvulsivante	39
6.3.1	Evaluación de la actividad sedante-hipnótica	40
7	Discusión de resultados	41
8	Conclusión.....	46
9	Referencias bibliográficas	47

II. Índice de figuras

Figura 1. <i>Sargassum buxifolium</i> y <i>Sargassum fluitans</i>	3
Figura 2. Aumento de la cantidad de sargazo en el caribe mexicano.....	4.
Figura 3. Metabolitos aislados de <i>Sargassum incisifolium</i>	5
Figura 4. Clasificación de las crisis de epilepsia.....	15
Figura 5. Estructura general del complejo receptor GABA.....	20
Figura 6. Prueba de campo abierto.....	26
Figura 7. Prueba de tablero perforado.....	27
Figura 8. Prueba del cilindro de exploración.....	27
Figura 9. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica.....	30
Figura 10. Actividad farmacológica de <i>S. Buxifolium</i>	38
Figura 11. Actividad farmacológica de <i>S. fluitans</i>	39

III. Índice de tablas

Tabla 1. Actividad biológica de algunas especies de <i>Sargassum</i>	6
Tabla 2. Contenido de N-P-K, presente en Sargazo.....	7
Tabla 3. Contenido químico del alga marina <i>Mucrocystis pynfera</i>	8
Tabla 4. Contenido bromatológico de <i>S. filipéndula</i>	8
Tabla 5. Efecto de la actividad anticonvulsiva de <i>S. buxifolium</i> y <i>S. fluitans</i>	40
Tabla 6. Efecto de la actividad sedante-hipnótica de <i>S. buxifolium</i> y <i>S. fluitans</i>	41

...

IV. Índice de diagramas

Diagrama 1: Método para la obtención de CL ₅₀	24
Diagrama 2. Bioensayo en <i>Artemia salina</i>	25
Diagrama 3. Diseño experimental para evaluar la actividad motora en ratones.....	29
Diagrama 4. Diseño experimental para evaluar la actividad anticonvulsiva en ratones mediante la administración de PTZ.....	31

V. Notaciones empleadas

A. salina	<i>Artemia salina</i>
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análisis de Varianza
BLA	Complejo Amígdala Basolateral
CeA	Complejo Amígdala Centromedial
Cl⁻	Ión Cloro
CL₅₀	Concentración Letal 50
CO₂	Dióxido de Carbono
CPF	Corteza Prefrontal Medial
DPZ	Diazepam
e.e.m.	Error Estándar Medio
FAE	Fármacos antiepilépticos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA_A	Receptor GABA subtipo A
i.p.	Intraperitoneal
ISO	Organización Internacional de Normalización
KA	Receptor Kainato
LGS	Ley General de Salud
LIC	Límite inferior de confianza
LSC	Límite superior de confianza
MTC	Medicina Tradicional China
NMDA	N-metil-d-aspartato
NMDAR	Receptor N-metil-d-aspartato
NOM	Norma Oficial Mexicana
N-P-K	Nitrógeno-Fósforo-Potasio
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo económico
PTZ	Pentilentetrazol
S	Género <i>Sargassum</i>
SE	Estimulación eléctrica
SNC	Sistema Nervioso Central
VEH	Vehículo

VI. Resumen

El Sargazo, está constituido por una mezcla de macroalgas particularmente del género *Sargassum* que se encuentran en masa flotando en el Océano. Actualmente, en México, el sargazo se ha concentrado en las costas de Yucatán y Quintana Roo, representando un problema de salud, económico y ambiental. Aunque existen algunas evidencias generadas a partir de la Medicina Tradicional China que especies de *Sargassum* pueden tener propiedades farmacológicas. En México no se tiene documentado algún uso terapéutico a estas especies vegetales marinas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible utilidad terapéutica en la ansiedad y la epilepsia de dos especies de *Sargassum*, seleccionadas porque se encuentran mayoritariamente en el Sargazo que llega a las costas de la Península de Yucatán. De las especies *S. fluitans* y *S. buxifolium*, se obtuvo un extracto metanólico, al cual se le realizó una prueba preliminar de citotoxicidad en *Artemia salina*. *S. fluitans* y *S. buxifolium* también se evaluaron en modelos de ansiedad y epilepsia a nivel preclínico en ratones. Los resultados obtenidos mostraron que ambos extractos presentan una inhibición de la actividad exploratoria de forma dependiente de la dosis, este efecto no está relacionado con un efecto sedante hipnótico debido a que los extractos no potenciaron el efecto de pentobarbital en los ratones. Y tampoco presentaron efecto anticonvulsivo en la prueba de pentilentetrazol.

Con los resultados obtenidos se sugiere que *S. fluitans* y *S. buxifolium* podrían tener utilidad terapéutica para el tratamiento de la ansiedad. Se requiere hacer más estudios para establecer el mecanismo transduccional de esta respuesta observada.

VII. Introducción

La búsqueda de nuevos compuestos químicos con potencial efecto terapéutico es una actividad constante debido a que la mayoría de los fármacos que se emplean en la actualidad pueden presentar baja eficacia terapéutica y/o reacciones adversas. Los organismos marinos representan una parte importante de la biodiversidad total existente en nuestro planeta. Algunas especies, como las algas, esponjas, corales, bacterias y peces entre otros son capaces de sintetizar moléculas bioactivas para defenderse de sus predadores o adaptarse a cambios ambientales como la temperatura, la luz, los nutrientes y de otros organismos; y son estas moléculas bioactivas las que son de interés farmacológico en el área de desarrollo de fármacos.

La fauna y la flora marina se caracterizan como una fuente promisoría de compuestos con potencial terapéutico y biomédico. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de éste ha sido estudiada en el área de desarrollo de fármacos. El género *Sargassum* contiene cerca de 400 especies y de éstas se han aislado aproximadamente 200 compuestos bioactivos [Liu et al., 2012].

Las algas del género *Sargassum* forman grandes mantos en aguas tropicales y subtropicales alrededor del mundo. En México, se les encuentra en forma muy abundante en todas sus costas; y desde el 2014 se han observado mayoritariamente en el Golfo de México y el Caribe. Anualmente se pueden colectar toneladas de *Sargassum*, a este material vegetal no se le ha dado aún utilidad, por lo que es considerado como un desperdicio y un problema en la actualidad.

El aumento de florecimientos de especies de *Sargassum* en las costas del Caribe Mexicano, la acumulación y descomposición de algas en playas y aguas litorales ha tenido grandes afectaciones sobre el ecosistema costero, la salud humana y la industria turística.

En el presente trabajo se muestra la evaluación farmacológica preliminar del efecto ansiolítico y anticonvulsivo en ratones de dos especies de *Sargassum*, *S. fluitans* y *S. buxifolium*, colectadas en la península de Yucatán.

1 Antecedentes

1.1 Desarrollo de fármacos

De acuerdo con la Ley General de Salud, en el artículo 221, se define como Fármaco a toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no presente forma farmacéutica, pero que reúna condiciones para ser empleada como ingrediente de un medicamento (LGS, Art 221).

Para que un fármaco sea considerado medicamento se requiere tener una forma farmacéutica. El desarrollo del medicamento conlleva muchos años de investigación; una vez que se detecta un compuesto con posible actividad biológica, este debe pasar por un proceso de caracterización y purificación para poder ser evaluado en la fase preclínica, en donde se establecen tanto los efectos terapéuticos como los efectos adversos o secundarios (Aulton, 2004).

El desarrollo de fármacos generalmente inicia con la etapa de descubrimiento, o fase cero, en la que se reúne información de una enfermedad que se desea controlar. Posteriormente se buscan compuestos con actividad biológica; esto puede llevar varios años de estudio. Los fármacos pueden provenir de un proceso químico sintético, pueden ser aislados a partir de plantas o animales, o pueden ser sintetizados mediante técnicas de ingeniería genética (Rang et al., 2012). Afortunadamente, el tiempo de investigación poco a poco se va reduciendo gracias al desarrollo de distintos métodos computacionales que permiten predecir el acoplamiento de compuestos nuevos con las dianas terapéuticas a través de la detección de estructuras proteicas. A nivel *in silico* se puede hacer un cribado virtual mediante modelos multiescala, así además de reducirse el tiempo también se disminuyen costos haciendo que el descubrimiento de fármacos se cada vez más específico (Lin y Li, 2020).

La fase preclínica de los compuestos con posible actividad terapéutica inicia con las pruebas de toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Posteriormente, se evalúa la farmacodinamia (mecanismos de acción) y la farmacocinética (procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción).

Después se continua con las fases clínicas I, II, III y IV. En la fase I se ensaya el compuesto bioactivo en pocos voluntarios sanos; se evalúa la seguridad, la tolerancia, la farmacocinética y se demuestra el efecto terapéutico en humano. En la fase II, se cuentan de 100-500 voluntarios enfermos, se evalúa la eficacia de las dosis propuestas como terapéuticas y se analizan los efectos adversos en los pacientes. En la fase III, se evalúan de 1000 a 12000 individuos, y en esta fase se establece la seguridad, la eficacia y los efectos adversos en pacientes que lo usarán de forma crónica, por lo tanto, se tiene un mejor control del grupo de estudio y es probable que el fármaco que aprueba en esta fase sea comercializado. Finalmente, en la fase IV, se envía a evaluación el fármaco a las instancias de regulación sanitaria y una vez que es aprobado, entra al mercado el fármaco, y con esto se tiene un seguimiento a largo plazo, se conocen comorbilidades, interacciones farmacológicas y efectos no deseados, y todo esto es apoyado de la farmacovigilancia (Shader, 2017).

Este proceso antes descrito se lleva a cabo en aproximadamente 15 años, y de casi 10,000 compuestos farmacológicos, sólo 1 o 2 llegan a ser aprobados, el desarrollo es muy ineficiente y la tasa de deserción del proceso abarca miles de productos (Brodniewicz y Gryniewicz, 2010), esto implica una inversión económica vinculada a mucho tiempo y trabajo.

Ante emergencias sanitarias, o enfermedades crónicas de carácter público que requieren terapias de baja efectividad se recurre al reposicionamiento. El reposicionamiento de un fármaco significa que éste puede ser utilizado en una patología para lo cual no fue diseñado y que no se sabía que tenían esa actividad farmacológica en particular. Esto permite la disminución de mucho tiempo de investigación y de la gran inversión que conlleva el desarrollo de un fármaco para una sola enfermedad. El principal problema del reposicionamiento es encontrar la relación fármaco-enfermedad, para esto se han desarrollado aproximaciones mediante enfoques computacionales, que se combinan con la evaluación biológica experimental. Así como el desarrollo de micro arreglos de biología molecular, en donde se combinan las bases de datos de los fármacos y bases de datos masivas de genómica (Xue y Li, 2018).

El origen de los compuestos bioactivos se remonta a la medicina tradicional, el conocimiento etnobotánico de la medicina tradicional permite obtener información empírica

referente al uso de las plantas como un remedio a enfermedades. Dentro de esta medicina tradicional, se tiene documentado el uso de plantas medicinales que provienen del mar. En la medicina tradicional China, por ejemplo, hay una gran aplicación de distintas especies de Sargazo, ya que se ha demostrado que los polisacáridos que tienen son los ingredientes bioactivos y, estos se utilizan como marcadores de control de calidad (Long y Zhang, 2016), y para el tratamiento de enfermedades.

1.2 El Sargazo

El sargazo tropical y subtropical de praderas marinas poco profundas está constituido por una mezcla de macroalgas (algas marinas pardas o cafés que flotan en el océano); particularmente, el género *Sargassum* perteneciente a la familia Sargassaceae del orden Fucales. Estas macroalgas dominantes de las regiones tropicales juegan un papel importante en la estructuración de los ecosistemas, a menudo el sargazo se separa de los arrecifes y forma una capa pelágica que llega a las costas. El género *Sargassum* se caracteriza morfológicamente por ser rizoide, lo que le permite fijarse al sustrato, tienen muchas hojas laterales en forma de talo y diversas vesículas en forma de esferas que le ayudan a la flotación (Figura 1) [Mattio y Payri, 2011; Liu *et al.*, 2012].

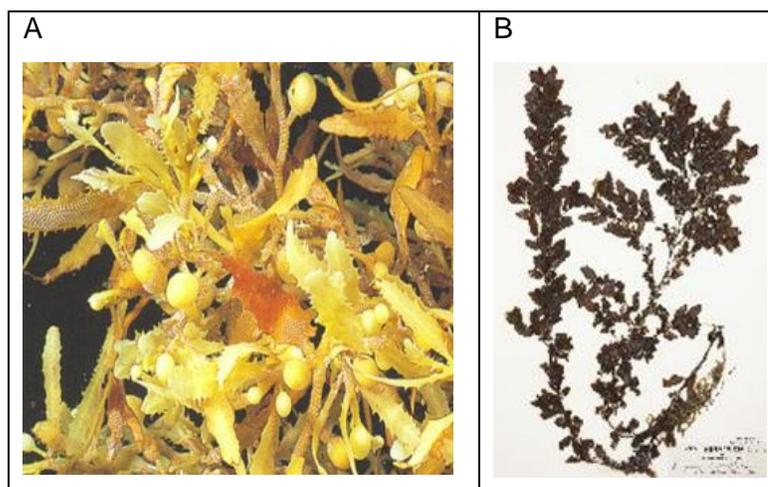


Figura 1. *Sargassum buxifolium* (panel A) y *Sargassum fluitans* (panel B)

El sargazo en México se ha convertido en un problema de salud pública (por ser capaz de provocar irritación de la piel, de los ojos y del tracto respiratorio) ya que al llegar a la playa el muestra una apariencia parda el alga, además de liberar sulfuro de hidrógeno, el cual produce un mal olor que aleja a las personas de la playa, por esto, representa un problema

también de carácter ambiental, mismo que afecta la economía y, por ende, el turismo en la zona de la península de Yucatán y Quintana Roo. Aunque la llegada de sargazo a la playa es impredecible, puede durar semanas, meses y en algunos años llega más que en otros. Por ejemplo, a partir del 2011 se incrementó la llegada de sargazo a las costas del caribe mexicano, pero en 2015 hubo un mayor incremento de la llegada de esta biomasa con respecto al 2014 (Figura 2) [Van Tussembroek *et al.*, 2017]. Actualmente llegan toneladas de sargazo en el Caribe Mexicano (Cancún, Puerto Morelos, Isla Mujeres, Tulum y Mahahual entre otras playas de gran afluencia turística) por lo que los hoteleros han solicitado el apoyo federal para retirar este material vegetal.

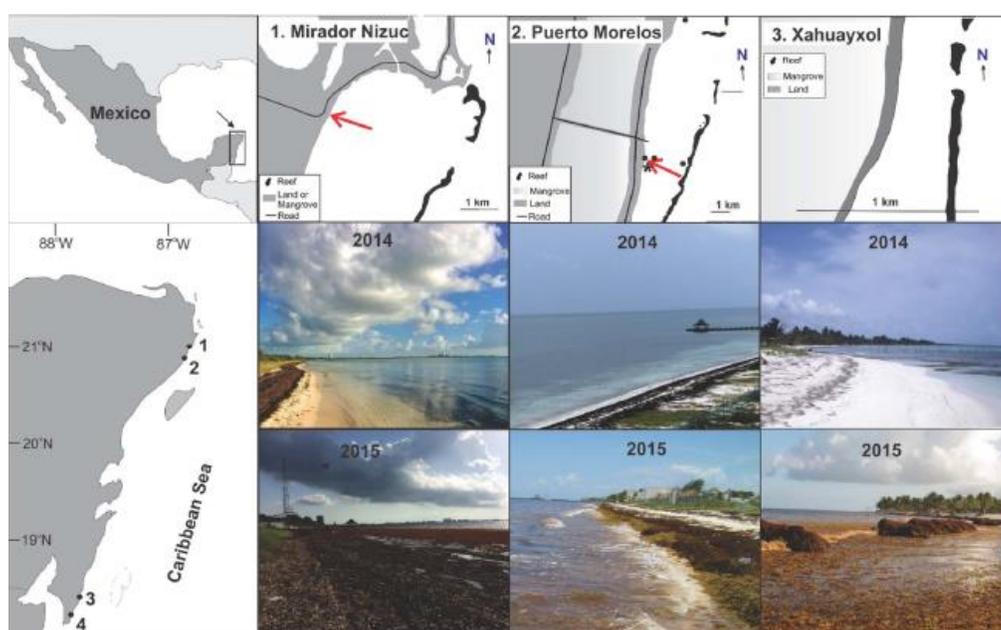


Figura 2. Aumento de la cantidad de sargazo en el caribe mexicano (año 2014-2015) [Van Tussembroek *et al.*, 2017]

1.3 Usos del Sargazo

El sargazo es una biomasa rica en compuestos como vitaminas, carotenoides, fibra, proteínas y minerales. Algunos metabolitos secundarios aislados de algunas especies de *Sargassum spp* son ficocoloides, terpenoides, flavonoides, esteroides, polisacáridos sulfatados, y polifenoles entre otros [Yende *et al.*, 2014]. Se estima que menos del 20% de todas las especies de *Sargassum* identificadas han sido investigadas por sus propiedades químicas y farmacológicas [Liu *et al.*, 2012]. A manera de ejemplo en la Figura 3 se

muestran algunos de los metabolitos aislados de *Sargassum incisifolium* [Nyambe *et al.*, 2019].

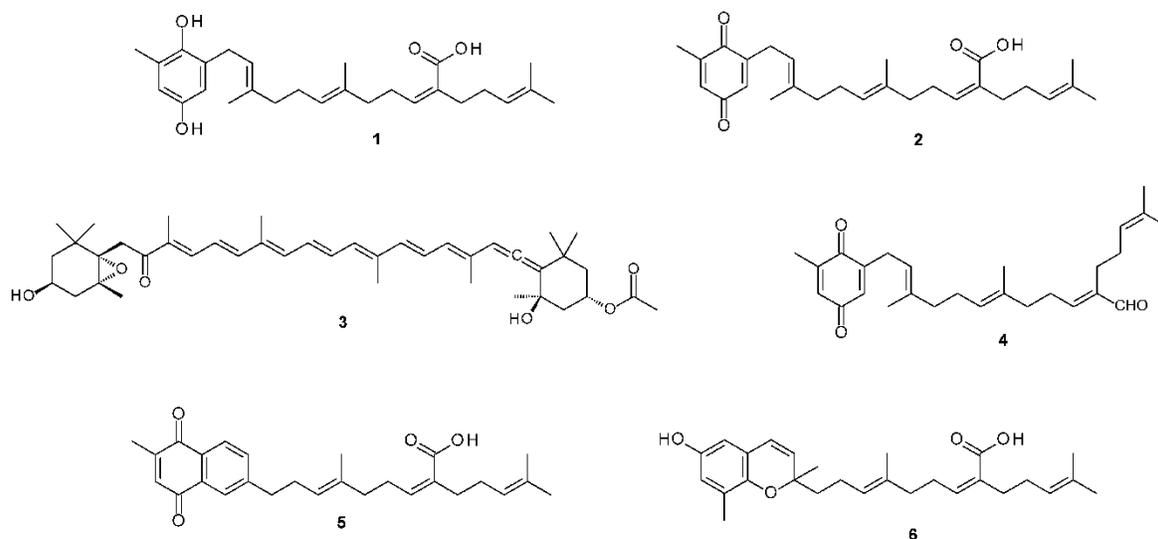


Figura 3. Metabolitos aislados de *Sargassum incisifolium*: ácido sargahidroquinico (1), ácido sargaquinico (2), fucoxantina (3) y sargaquinal (4), derivado semi-sintético de ácido sarganaftoquinico (5) y ácido sargachromenico (6) [Nyambe *et al.*, 2019].

1.4 Utilidad del Sargazo en la actividad biológica

Las algas marinas han sido utilizadas desde hace siglos dentro de la medicina tradicional, sobre todo en países como China [Liu *et al.*, 2012]. Particularmente, de algunas especies de *Sargassum* se han aislado metabolitos activos como terpenoides, flavonoides, esteroides, polisacáridos sulfatados, polifenoles, sargacromenol, ácido sargaquinico y feofitina son algunos ejemplos. Estos compuestos han mostrado tener actividad antinociceptiva, antiinflamatoria, hipotensora, antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante, antitumoral y antiviral; efecto fibrinolítico, inmunomodulador, hepatoprotector, y neuroprotector también ha sido reportado [Yende *et al.*, 2014]. Uno de los compuestos más prometedores que se ha aislado de *Sargassum fulvellum* es la fucoxantina, este compuesto ha demostrado tener propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas y se ha sugerido para el tratamiento de la obesidad [D'Orazio *et al.*, 2012]. En la Tabla 1, se muestra una lista de actividades terapéuticas que se le han atribuido a especies de *Sargassum*.

Tabla 1. Actividad biológica de algunas especies de *Sargassum*.

Especie	Actividad biológica de los extractos	Referencia
<i>Sargassum thunbergii</i>	Antioxidante	Kang et al., 2019
<i>Sargassum pallidum</i>	Antioxidante e hipoglucémica	Xiao et al., 2019
<i>Sargassum fluitans</i>	Hepatoprotector	Quintal-Novelo et al., 2018
<i>Sargassum serratifolium</i>	Antioxidante	Lim et al., 2018
<i>Sargassum polycystum</i>	Antibacterial	Palanisamy et al., 2018
<i>Sargassum serratifolium</i>	Antiinflamatorio	Park et al., 2018
<i>Sargassum stenophyllum</i>	Antitumoral	Dias et al., 2018
<i>Sargassum wightii</i>	Anticancerígena, antimicrobiana y actividad fotocatalítica	Pugazhendhi et al., 2018
<i>Sargassum angustifolium</i>	Citotóxica en líneas celulares de cáncer cervical y mama	Vaseghi et al., 2018
<i>Sargassum sagamianum</i>	Actividad inhibitoria moderada de acetilcolinesterasa	Yende et al., 2014
<i>Sargassum hemiphyllum</i>	Efecto neuroprotector	Huang et al., 2017
<i>Sargassum crassifolium</i>	Efecto neuroprotector	Yang et al., 2017

1.5 Utilidad del Sargazo en la agricultura

El sargazo también se ha propuesto como una fuente potencial para producir fertilizantes, en la Tabla 2, se puede observar el contenido de N-P-K (Nitrógeno-Fósforo-Potasio) de acuerdo a esto, la proporción de 1:10:3 es adecuada para los cultivos [Williams y Feagin, 2010; Oyesiku y Egunyomi, 2014].

Tabla 2. Contenido de Nitrógeno-Fósforo-Potasio presente en Sargazo.

Componente	Contenido
Nitrógeno	6.3mg/100mg
Fósforo	96.5mg/100g
Potasio	28mg/100g

Compuestos de tipo polisacáridos de alginato aislados del sargazo contribuyen al crecimiento adecuado crecimiento en cultivos de maíz [Wang *et al.*, 2016].

1.6 Utilidad del Sargazo en la industria cosmética

Algunas especies de sargazo han sido estudiadas con la finalidad de utilizar los extractos en productos cosméticos. Se conoce que algunas especies tienen propiedades bondadosas para el cuidado de la piel; por ejemplo, el sargafurano es un compuesto aislado de *Sargassum macrocarpum*, con actividad antibacterial y actúa sobre bacterias presentes en el acné [Kamei *et al.*, 2009]. Otros extractos obtenidos de *Sargassum polycystum* y *Sargassum silquastrum* reducen la síntesis de melanina en células de murino y en peces cebra respectivamente, ambas algas se han propuesto para el tratamiento de pigmentación en la piel [Cha *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2011]. Así mismo, se ha demostrado que el extracto acuoso de *Sargassum glaucescens* es útil para el cuidado de la piel, ya que tiene actividad antioxidante y efecto para contrarrestar los daños causados por radiación UVA en fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos; el extracto fue capaz de suprimir la producción de especies reactivas de oxígeno y estimular la viabilidad celular [Zih-yi *et al.*, 2019].

1.7 Utilidad del Sargazo como alimento

Algunos estudios indican que el sargazo es fuente de minerales, carbohidratos y algunos aminoácidos esenciales como la isoleucina, leucina, lisina, metionina, cistina, fenilalanina, tirosina, treonina, valina, arginina, histidina, alanina, asparagina, triptófano, ácido aspártico, glutamina, glicina, prolina y serina [Castro-González *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2005]. En la tabla 3, se muestra el contenido químico del alga marina *Mucrocystis pynfera*.

Tabla 3. Contenido químico del alga marina *Mucrocystis pynfera*

Modificado de Castro-González y Carrillo-Domínguez, 1994.

<i>Mucrocystis pynfera</i>					
Carbohidratos	46.27	Fenilalanina	3.78	Alanina	11.47
Isoleucina	3.20	Tirosina	2.68	Prolina	3.73
Leucina	5.76	Serina	4.44	Triptofano	0.99
Lisina	5.05	Valina	4.45	Ácido aspártico	10.04
Metionina	2.05	Arginina	3.82	Ácido glutámico	13.83
Cisteína	3.15	Histidina	1.30	Glicina	4.83

* Contenido de aminoácidos y carbohidratos en el alga marina *Mucrocystis pynfera* recolectada en verano (g/100 g de proteína).

Así mismo, en la tabla 4, se muestra a manera de ejemplo el contenido bromatológico de *Sargassum filipendula*, este tipo de algas tienen un alto contenido de hierro y fibra; la mayor parte de sus polisacáridos estructurales y de reserva incluyen alginatos, furanos y celulosa [Sierra-Vélez y Álvarez-León, 2009].

Tabla 4. Contenido bromatológico de *S. filipéndula*

Modificado de Sierra-Vélez y Álvarez-León, 2009.

<i>Sargassum filipéndula</i>					
Humedad	12.5	Fibra bruta	48.95	Calcio	5.71
Materia seca	87.5	Grasa Total	0.15	Magnesio	1.02
Nitrógeno	1.44	Cenizas totales	38.06	Potasio	2.9
Proteína bruta	9.0	Fósforo	0.05	Sodio	0.15
Hierro*	28.84	Zinc*	11.67	Manganeso*	49.35
Cobre*	3.57				

Resultados en base seca. Concentraciones expresadas en % *expresado en ppm

De acuerdo a su composición bromatológica se ha propuesto que el sargazo puede ser de utilidad como alimento para algunas especies animales. Por ejemplo, la harina preparada con *Sargassum* spp mejora la tasa de crecimiento del camarón blanco (*Litopenaeus*

vannamei) y café (*Farfantepenaeus californiensis*) debido al alto contenido de potasio, sodio, magnesio, calcio, trazas de hierro, cobre y zinc, además de contener carbohidratos, vitamina C y retinol [Casas-Valdez *et al.*, 2006]. Incluso contribuye a mejorar la respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei* [Chen *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2018] y reduce su concentración de colesterol [Casas-Valdez *et al.*, 2006]. La harina de *Sargassum spp* también ha sido empleada como suplemento en dietas para gallinas, mejorando la calidad del huevo y disminuyendo el contenido de colesterol [Sierra-Vélez y Álvarez-León, 2009]. El sargazo, también se utilizó de forma experimental en la alimentación de ovejas, obteniendo buenos resultados a nivel metabólico [Sierra-Vélez y Álvarez-León, 2009; Casas-Valdez *et al.*, 2006a] y se ha propuesto como una alternativa para la elaboración de forraje para cabras [Casas-Valdez *et al.*, 2006].

1.8 Investigación del Sargazo en México

Actualmente, el uso del *Sargassum* en México es un tema político y económico más que científico. Aunque se sabe que el *Sargassum* se podría considerar como una fuente para la extracción de alginatos, la falta de un diseño industrial, el costo internacional de los alginatos, las políticas para otorgar las concesiones de los mantos de algas explotables y el papel de los inversionistas han limitado la producción de alginatos a nivel comercial en México [Hernández-Carmona *et al.*, 2012]. A continuación, se presenta algunas investigaciones efectuadas para darle uso a este recurso natural que se está desperdiciando en las costas mexicanas y que pueda aportar un posible beneficio a la población.

Considerando las propiedades bromatológicas del *Sargassum spp*, se ha propuesto utilizar harina de *Sargassum* para la elaboración de galletas, debido a que tienen mayor contenido mineral (3.2 veces) y en fibra (2.7 veces), comparada con la harina de trigo [Velasco-González *et al.*, 2013]. También se ha propuesto el uso del *Sargassum spp* como forraje suplementario para ganado vacuno debido a sus altas concentraciones de carbohidratos, minerales y lípidos que pueden ayudar a satisfacer los requerimientos de mantenimiento de éstos animales, especialmente cuando no hay disponibilidad de gramíneas en temporada de sequía en Baja California [Vega-Villasante *et al.*, 2006; Gojon Báez *et al.*, 1998]. Sin embargo, no se ha impulsado mucho el uso del sargazo en el área de alimentos debido a que algunas especies como *Sargassum fusiforme* presentan altas concentraciones de arsénico [Yokoi y Konomi 2012]

En el ámbito farmacológico, son mínimas las investigaciones que se han desarrollado sobre las especies *Sargassum*. Algunos estudios son los siguientes; el extracto etanólico de *Sargassum horridum* tiene la capacidad de revertir la resistencia a antibióticos en contra de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [Muñoz-Ochoa et al., 2010]. De esta especie de *Sargassum* se aisló el fucosterol, un compuesto con actividad para inhibir a la acetilcolinesterasa [Castro-Silva et al., 2018]. Otra especie que se ha estudiado es *Sargassum fluitans*, el extracto etanólico tiene propiedades hepatoprotectoras, inhibiendo la inflamación y fibrosis en ratones [Quintal-Novelo et al., 2018].

1.9 Generalidades de la ansiedad

La ansiedad es un estado emocional negativo frecuente que se caracteriza por sentimientos de preocupación y aprensión, y que se acompaña de manifestaciones somáticas, cognitivas y conductuales específicas. La ansiedad se puede distinguir del miedo en que es un estado inespecífico de mayor conciencia y aprensión, mientras que el miedo se dirige a una amenaza identificada específica. Es común asociar la angustia con la ansiedad, Joseph Lévy-Valensi, definió a la ansiedad, "Ansiété", como un oscuro y angustiante sentimiento de expectativa e incluye los aspectos psicológicos y cognitivos de la preocupación. Por el contrario, la angustia, "angoisse", la definió como la experiencia que afecta a los músculos de todos los sistemas: espasmo bronquial, dificultad para respirar, calambres intestinales, vaginismo, urinaria urgencia, pseudoangina de pecho, dolor de cabeza (Crocq, 2015).

La ansiedad es parte del repertorio conductual normal y es valiosa como mecanismo de defensa para aumentar la conciencia y la capacidad de respuesta para enfrentar situaciones nuevas. No obstante, cuando es excesivamente grave o frecuente o aparece en contextos inadecuados, puede interferir en el funcionamiento normal y por tanto puede considerarse patológico (Mula, 2016). El límite entre la ansiedad "normal" y la ansiedad "patológica" no es fácil de definir y puede variar entre los individuos en función de los rasgos de personalidad o, en particular, en función de lo que se ha descrito como un "estilo cognitivo propenso a la ansiedad" (Uhlenhuth et al., 2002; Ganellen et al., 1986; Starcevic et al., 2012).

Muchas regiones del cerebro parecen estar involucradas en el reconocimiento y la regulación de estímulos emocionales negativos y en la generación de respuestas cognitivas, conductuales o somáticas a estos estímulos. No obstante, un conjunto de

estructuras límbicas parece ser fundamental para la regulación de las emociones negativas. En particular, la amígdala, núcleos situados en los lóbulos temporales medianos, parece jugar un papel crucial. A través de la investigación en animales de experimentación se ha establecido un circuito neuronal. Aunque los datos de las imágenes funcionales son consistentes con este modelo, debe tenerse en cuenta que estas vías no se han demostrado de manera concluyente en el cerebro humano.

En los seres humanos, las lesiones bilaterales de la amígdala se han asociado con deficiencias en el reconocimiento de las expresiones faciales de miedo y otras emociones negativas. Los pacientes con trastornos de ansiedad parecen activar la amígdala en respuesta a un estímulo dado, el reconocimiento de que la activación de la amígdala está vinculada a la ansiedad, los tratamientos con la terapia cognitivo-conductual conduce a la extinción de esta hiperactivación de la amígdala (Straube et al., 2006).

La amígdala está compuesta por varios núcleos distintos uno de ellos es el complejo amígdala basolateral (BLA) y el complejo amígdala centromedial, en particular el núcleo central (CeA). El BLA recibe información entrante sobre señales emocionales potencialmente negativas del tálamo y la corteza de asociación sensorial (Figura 1). El BLA activa el CeA directamente a través de una vía glutamatérgica excitadora, así como interneuronas GABAérgicas inhibitorias, las neuronas intercaladas, que se encuentran entre el BLA y el CeA y ejercen una influencia inhibitoria sobre este último. Las neuronas inhibitorias GABAérgicas se proyectan desde el CeA hasta el hipotálamo y el tronco encefálico; La activación de estas neuronas conduce a las manifestaciones somáticas de ansiedad. Además del papel de la amígdala en la regulación de la ansiedad, las áreas del prosencéfalo como la corteza prefrontal medial (CPF) y la corteza cingulada anterior también parecen desempeñar un papel importante. Estas áreas corticales reciben y envían proyecciones glutamatérgicas excitadoras hacia y desde el BLA, y se activan concomitantemente con la amígdala durante la presentación de estímulos emocionales.

La neurotransmisión GABAérgica en la amígdala es un candidato prometedor para la modulación de las respuestas relacionadas con la ansiedad. Varias líneas de investigación en animales de experimentación han proporcionado evidencia de un papel importante de la neurotransmisión GABAérgica en la amígdala en la modulación de los comportamientos relacionados con la ansiedad. Por ejemplo, las infusiones de GABA o agonistas del receptor

de GABA en la amígdala disminuyen las medidas de miedo y ansiedad en varias especies animales, mientras que las infusiones de antagonistas de GABA tienden a tener efectos ansiogénicos (Sanders et al., 1995; Barbalho et al., 2009). Asimismo, la desactivación selectiva de la expresión de la enzima sintética GABA ácido glutámico, la descarboxilasa en la amígdala conduce a la pérdida de la respuesta ansiolítica a las benzodiazepinas. En humanos, la administración de benzodiazepinas atenúa la activación de la amígdala en presencia de estímulos emocionales negativos.

Como se describió anteriormente, las neuronas intercaladas GABAérgicas que se encuentran completamente dentro de la amígdala regulan la activación de la CeA por la BLA. Además, estas neuronas también son un objetivo principal de la proyección glutamatérgica excitadora de la CPF a la amígdala y hacen numerosos contactos monosinápticos entre diferentes grupos de neuronas intercaladas (Busti et al., 2011). Estas neuronas poseen una conductancia de potasio que se desactiva lentamente, lo que confiere ellos tienen la capacidad de modificar su patrón de activación en respuesta a cambios en la actividad general dentro de la amígdala (Pinto et al., 2008). Estas neuronas GABAérgicas están, por lo tanto, bien ubicadas para desempeñar un papel modulador clave en la entrada de información relacionada con la ansiedad en la amígdala (Marowsky et al., 2005).

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) y se ha estimado que al menos un tercio de todas las neuronas del SNC utilizan GABA como su neurotransmisor principal. La inhibición GABAérgica es esencial para mantener un equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal, para tener un estricto control temporal y espacial de la señalización trans-sináptica, la modulación temporal de la excitabilidad neuronal y para mantener las actividades oscilatorias de "marcapasos" en numerosas regiones del cerebro. La mayoría de las neuronas que contienen GABA son interneuronas, que controlan la excitabilidad de los circuitos locales dentro de un cerebro determinado, el tálamo y la corteza son algunas vías de proyección principales GABAérgicas (Klausberger y Somogyi, 2008).

La inhibición neuronal por GABA está mediada por dos clases distintas de receptores GABA. Los receptores ionotrópicos GABA_A son canales de cloruro regulados por ligando de acción rápida responsables de la inhibición rápida, (Sieghart et al., 2006) mientras que los receptores metabotrópicos GABA_B se acoplan indirectamente a través de proteínas G a

los canales de calcio o potasio para producir respuestas inhibitorias lentas y prolongadas (Bowery, 2010).

La activación de los receptores GABA_A provoca un aumento inmediato y sustancial de la conductancia del ion cloruro a través de la membrana celular, lo que hace que la neurona no pueda aumentar su potencial de acción y conduce a una inhibición "fásica" de la neurona. Las concentraciones bajas (submicromolares) de GABA en el espacio extracelular puede activar persistentemente los receptores extrasinápticos GABA_A para generar un estado inhibitor persistente o "tónico", por el cual la neurona responderá menos a los estímulos excitadores (Mody y Pearce, 2004).

El receptor GABA_A es un heterooligómero compuesto por cinco subunidades de proteínas que atraviesan la membrana neuronal (formando un cilindro), la activación del receptor por GABA provoca un cambio conformacional en las subunidades proteicas que conduce a la creación transitoria de un poro a lo largo del eje del cilindro a través del cual, los iones cloruro pueden fluir de un lado de la membrana a otro. Las subunidades de proteínas que componen el receptor GABA_A pueden agruparse en diferentes familias en función de su secuencia de aminoácidos. La mayoría de los receptores GABA_A en el SNC están compuestos por dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ . Otras familias incluyen las subunidades δ , ϵ y π , que sustituyen a la subunidad γ en ciertos tipos de células, la subunidad θ , que puede sustituir a la subunidad β , y la subunidad ρ , expresada predominantemente en la retina, que forma homo- receptores oligoméricos GABA_A (Sieghart et al., 2002).

Los trastornos de ansiedad se encuentran entre los trastornos psiquiátricos incapacitantes más prevalentes en todo el mundo. La investigación básica ha proporcionado conocimientos críticos sobre el mecanismo que regula el comportamiento del miedo en los animales y se han desarrollado una serie de modelos animales para seleccionar compuestos en busca de propiedades ansiolíticas. A pesar de este progreso, en más de dos décadas no ha salido al mercado ningún agente mecánicamente nuevo para el tratamiento de la ansiedad. (Locke et al., 2015).

La ansiedad, está casi siempre relacionada directamente a la depresión, la depresión cada vez se vuelve un más peligrosa para la salud física y mental de los humanos, la OMS en el año 2017 predecía que para el año 2020 sería una de las causas de muerte poco comunes

y de discapacidad, y pese a que se cuenta con tratamientos farmacológicos, no se descartan tratamientos alternativos, como los que ofrece la Medicina Tradicional China (MTC), de forma natural (Zhang y Tian, 2017).

Los trastornos de ansiedad tienen una comorbilidad psiquiátrica en pacientes con epilepsia, mismo que afecta tanto el pronóstico como la calidad de vida, desde una perspectiva neurobiológica, y gracias a los modelos de este tipo, se puede conocer que la existe una red extensa anatómica del cerebro con la amígdala como centro, la amígdala es de importancia ya que es determinante en la experiencia de miedo, la activación de forma espontánea de estos circuitos del miedo es la hipótesis más podría explicar los síntomas en los trastornos de ansiedad, en dicho proceso, las neuronas tienen un papel fundamental, ya que el estallido típico de las neuronas epilépticas, y esto explica por qué los tratamientos que son utilizados para epilepsia, son de igual forma efectivos para el tratamiento de la ansiedad (Mula et al., 2007)

1.10 Generalidades de la epilepsia

La Liga Internacional contra la Epilepsia, redefinió la epilepsia como una "enfermedad" y no como un "trastorno" (Fisher et al., 2014). Es una de las enfermedades más comunes del Sistema Nervioso Central (SNC), el término "enfermedad" enfatiza mejor a los pacientes, médicos y sociedad la importancia y el impacto de la epilepsia, como el que tienen otras enfermedades (Falco-Walter, et al., 2018).

La clasificación de las convulsiones ha ido cambiando a lo largo de los años, desde 1981, cuando se dividieron en parciales o generalizadas, para posteriormente las convulsiones parciales definirse como epilépticas, siguiendo con la clasificación se introdujeron clasificaciones que involucraban síntomas y o activaciones específicas, dado que esto fue en la década de los 80's se tuvo un avance en tecnología e investigaciones, por lo cual, actualmente se cuenta con una clasificación actualizada (Figura 4), mucho más amplia y útil para el tratamiento de estas crisis.



Figura 4. Clasificación de las crisis de epilepsia (Modificado de Pack, 2019).

La epilepsia se caracteriza ampliamente por una excitabilidad neuronal aberrante. La señalización neuronal normal requiere una orquesta compleja de eventos presinápticos y postsinápticos mediados por vías de señalización intracelular y expresión génica. Tales cambios a corto y largo plazo pueden ocurrir simultáneamente y por separado, de manera dependiente e independiente. Sin embargo, la señalización normal falla en condiciones patológicas, como la epilepsia. La actividad celular y de red aberrante resultante produce

un cambio en la conectividad y la sincronidad que contribuye a la progresión de la enfermedad.

En la epilepsia, la actividad de la red asincrónica crónica induce descargas neuronales extrañas y alteraciones patológicas en la señalización que pueden surgir de múltiples vías. Un factor que está muy implicado en gran parte de la señalización aberrante y la patología resultante de la epilepsia es el neurotransmisor glutamato.

El glutamato es el neurotransmisor excitador predominante del cerebro de los mamíferos adultos y es fundamental para la ejecución normal de numerosos procesos. La liberación presináptica de glutamato dependiente del calcio en la hendidura sináptica es impulsada en respuesta a la despolarización neuronal. El glutamato, como el neurotransmisor inhibitor del ácido γ -aminobutírico (GABA), media sus efectos excitadores a través de varias subclases de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. De los receptores de glutamato ionotrópicos postsinápticos, los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) son fundamentales para la neurotransmisión excitadora rápida, mientras que los receptores de N-metil-d-aspartato (NMDA) median gran parte de los potenciales excitadores postsinápticos lentos esenciales para el procesamiento de la información global. El glutamato también puede interactuar con un receptor de glutamato ionotrópico adicional, el receptor de kainato (KA). El receptor KA tiene un papel menos claramente entendido en la señalización neuronal que puede incluir tanto la modulación pre y postsináptica de la neurotransmisión excitadora (Contractor et al., 2000; Lerma y Marques 2013). El efecto del glutamato sobre estos subtipos de receptores estimula así una serie de eventos presinápticos y postsinápticos, todos los cuales subyacen a la actividad neuronal normal y anormal.

La mayor parte de la transmisión sináptica excitadora rápida se produce a través de la regulación presináptica de la liberación de glutamato o mediante el fortalecimiento o debilitamiento postsináptico de las conexiones neuronales en las sinapsis a través de cambios en la localización del receptor AMPA. El ciclo del receptor AMPA sinápticos promueve la potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo (Anggono y Hugarir 2012). Además, la plasticidad homeostática facilita las respuestas plásticas de larga duración a las modificaciones subcelulares en la transmisión sináptica sin alteraciones a gran escala en la conectividad regional (Turrigiano 2007, 2012). La actividad del circuito

neuronal y la actividad sináptica pasada en las sinapsis individuales regulan el número, la localización sináptica (externalizada o internalizada) y la composición de subunidades de los receptores AMPA. Por lo tanto, las neuronas pueden fortalecer o debilitar su respuesta a la entrada de excitación. Los cambios en la fuerza sináptica relativa ciertamente contribuyen a cambios a largo plazo en los neurocircuitos del cerebro. La remodelación sináptica contribuye en última instancia a la desestabilización neuronal, debido a la facilidad aumentada o disminuida con la que una neurona postsináptica puede despolarizarse por entrada presináptica. Por esta razón, la actividad neuronal aberrante como se ve dentro de una red epiléptica probablemente conduce a un recableado a largo plazo dentro de las redes neuronales, un efecto que contribuye a la hiperexcitabilidad de la red asociada con la epilepsia (Chen et al., 1999; Leite et al., 2005).

Para contrarrestar estos cambios rápidos y desestabilizadores en las espinas individuales, las neuronas también experimentan plasticidad homeostática, que puede estabilizar la actividad a nivel de neurona individual y también a nivel de circuito (Anggono y Huganir 2012), efectos que ayudan a mantener un "punto de ajuste" específico (Turrigiano 2012). Cuando la actividad neuronal o del circuito se desvía de este punto de ajuste, responden de una manera que intenta restaurar la actividad y reducir la excitabilidad. En la epilepsia, la actividad repetida de la red desincronica puede modificar el "punto de ajuste" del circuito, como se observa dentro del microcircuito corteza entorrinal-hipocampo (Coulter et al., 2011). Mecánicamente, la actividad sináptica extraña da como resultado un aumento del calcio intracelular, la transcripción de genes y la activación de las quinasas de señalización (Seeburg et al. 2008; Goold y Nicoll 2010). En conjunto, estos cambios probablemente contribuyan a las características distintivas de la epilepsia del lóbulo temporal, incluida la pérdida neuronal, la gliosis y el brote de fibras musgosas (Leite et al., 2005). Estos cambios también pueden cambiar el grado de acumulación del receptor AMPA inducida por la actividad en las sinapsis (Seeburg et al., 2008), lo que podría dar lugar a una mayor eficiencia sináptica o contribuir a una mayor liberación de glutamato aberrante. De hecho, la expresión del receptor AMPA que contiene GluA2 impermeable al calcio aumenta en la corteza cerebral de rata después del estado epiléptico inducido por pilocarpina (Russo et al., 2013), lo que demuestra un cambio potencial a largo plazo en la neuroplasticidad que puede contribuir a la neuroprotección contra la neurotoxicidad inducida. Con la hiperactividad de red observada de la epilepsia, el cambio de punto de ajuste resultante

puede ser la base de modificaciones a largo plazo en la conectividad neuronal y los circuitos para contribuir a la ictogénesis y la epileptogénesis.

La evidencia del papel del glutamato en las convulsiones y la epileptogénesis se encuentra en modelos animales y humanos durante la estimulación eléctrica. Por ejemplo, la epilepsia inducida por dosis elevadas de agentes nerviosos subletales a letales se asocia con una acumulación excesiva de acetilcolina y un reclutamiento secundario de señalización glutamatérgica excitadora (Lallement et al. 1991). La liberación de glutamato inducida por un estatus epiléptico provoca una sobreestimulación de los receptores de glutamato, incluidos los NMDAR, actividad convulsiva sostenida a largo plazo y desarrollo de daño cerebral inducido por convulsiones (McDonough y Shih 1997; Dorandeu et al. 2013a). Con estatus epiléptico prolongado, los receptores GABA se internalizan y los NMDAR migran a las sinapsis neuronales (Wasterlain y Chen 2008; Naylor et al., 2013; Wasterlain et al., 2013), todos los efectos que conducen a una inhibición e hiperexcitabilidad reducidas. Estos cambios inducidos por SE en la localización del receptor destacan por qué los fármacos que se dirigen a la neurotransmisión GABAérgica probablemente no supriman las convulsiones asociadas con SE sostenida, mientras que el tratamiento con antagonistas de NMDAR en combinación con agonistas de GABA y otros agentes a menudo puede atenuar con éxito el SE experimental.

Los antagonistas de NMDAR como MK-801 o ketamina pueden suprimir las convulsiones y ser neuroprotectores después de una estimulación eléctrica prolongada (Dorandeu et al. 2013a, b). Por tanto, la modulación de la señalización glutamatérgica a nivel del receptor NMDA juega un papel crítico en la mitigación del daño inducido por el estatus epiléptico. Se reconoce ampliamente que el daño extenso asociado con la estimulación eléctrica prolongada representa un riesgo para el desarrollo de epilepsia. La remodelación a largo plazo de la conectividad sináptica y la morfología dendrítica mediada por el receptor NMDA puede contribuir a la aparición de convulsiones recurrentes espontáneas. Las subunidades del receptor NMDA experimentan modificaciones postranscripcionales y cambios epigenéticos en respuesta a estatus epiléptico (Ryley Parrish et al., 2013), efectos que contribuyen a cambios duraderos en la conectividad del circuito. Por estas razones, dirigirse específicamente al sistema glutamatérgico con antagonistas del receptor NMDA puede prevenir eficazmente la epileptogénesis después del estatus epiléptico (Osterweil et al., 2013). Además, la inhibición del micro ARN-134 específico del cerebro, que participa en los

procesos necesarios para la remodelación de la columna dependiente del receptor NMDA (Schratt et al., 2006), puede prevenir convulsiones recurrentes espontáneas meses después de la estimulación eléctrica.

El tratamiento para estas enfermedades del Sistema Nervioso Central, son generalmente de carácter farmacológico. Las benzodiazepinas, incluidos el diazepam y el midazolam, son la base del tratamiento para las emergencias convulsivas, incluidas las convulsiones agudas repetitivas (Rogawski y Heller, 2019). Estos son eficaces para reducir la ansiedad y existe una relación dosis-respuesta asociada a la tolerancia, sedación, confusión y aumento de la mortalidad (Locke et al., 2015). La medicina tradicional a base de hierbas juega un papel importante en el tratamiento de la epilepsia, aunque la medicina herbolaria se usa ampliamente en el tratamiento antiepiléptico, hay una falta de evidencia sólida sobre la eficacia y toxicidad de la mayoría de las plantas medicinales (Liu y Ge, 2017).

Los fármacos antiepilépticos (FAE) no suelen clasificarse en categorías por su mecanismo de acción, sino por su acción a nivel molecular, ya que actualmente se conoce que es más de uno. Entre los posibles, se encuentra la potenciación de la inhibición GABAérgica y la modulación de los canales de calcio son probablemente los que pueden ser valiosos porque se relaciona la fisiopatología de la ansiedad. La subunidad GABA_A del receptor GABA, es la encargada de regular la excitabilidad y los cambios repentinos en la excitación que producen el miedo, la ansiedad, el pánico y la respuesta aguda al estrés.

Para esto, existen los fármacos que estimulan el GABA_A y se acoplan a los receptores, como las benzodiazepinas que tienen efectos ansiolíticos y los barbitúricos que tienen efectos anticonvulsivos, a través de la reducción mediada por GABA_A de excitabilidad neuronal (Mula et al., 2007)

Los receptores GABA se componen de proteínas unidas a la membrana que se pueden dividir en dos subtipos. Los receptores GABA A de carácter ionotrópico y se forma a partir de cinco subunidades (Figura 1), estas forman un canal de cloruro integral. Son los receptores GABA A en su mayoría responsables de la neurotransmisión de carácter inhibitorio en el sistema nervioso central y los receptores GABA B, de carácter metabotrópico, formados por péptidos individuales, su mecanismo de transducción de señales se basa en el acoplamiento con las proteínas G (Oikkola y Ahonen, 2008).

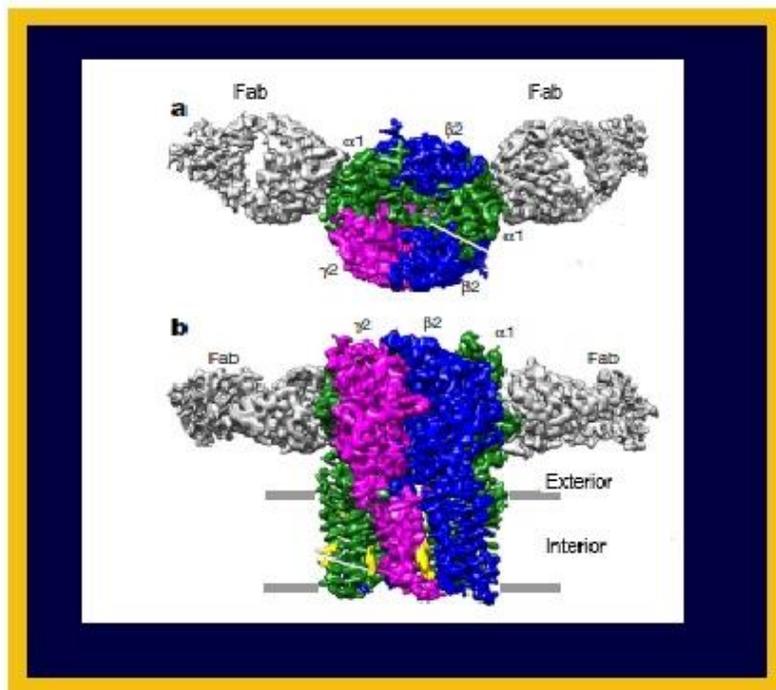


Figura 5. Estructura general del complejo receptor GABA. A, B, Vista superior y vistas laterales de la reconstrucción 3D del complejo Fab-receptor GABA, por subunidad. $\alpha 1$, verde; $\beta 2$, azul; $\gamma 2$, magenta; Fab, gris. (Modificado de Zhu-Noviello, 2018).

La evidencia de estudios clínicos indica que el receptor GABA tiene un importante papel en el mecanismo y el tratamiento de la epilepsia, Las convulsiones epilépticas pueden estar relacionadas con las descargas eléctricas transitorias de forma explosiva en el cerebro que resultan de demasiada excitación o muy poca inhibición en la zona en la que la descarga anormal empieza. De acuerdo a estudios, los agonistas de GABA suprimen las convulsiones, y los antagonistas de GABA producen convulsiones (Treiman, 2001).

2 Planteamiento del problema

El sargazo proveniente del Atlántico Sur, se ha convertido en un problema principalmente para la zona de la Riviera maya, ya que llegan en toneladas anuales a las costas de la península de Yucatán y Quintana Roo. Actualmente el gobierno mexicano, ha invertido recursos para mitigar el problema, ya que, al presentarse este problema, representa un desincentivo para los visitantes tanto nacionales, como extranjeros de estos lugares y playas mexicanas. Hoy en día en países como Cuba, China, Filipinas, Japón, Colombia etc., se genera investigación científica para darle utilidad al sargazo en diferentes áreas, mientras que en México solo es retirado de las costas y no se le ha dado mucha utilidad, aunque si ha despertado la curiosidad científica y actualmente hay proyectos aislados para generar biodiesel con el alga, construir casas con ladrillos hechos de sargazo, cultivar hongos y fabricar zapatos y cuadernos.

El presente proyecto tiene como finalidad realizar un cernimiento farmacológico para establecer el posible potencial terapéutico de algunas especies de *Sargassum* como *Sargassum fluitans* y *Sargassum buxifolium* y así proponer un uso a este material vegetal.

3 Hipótesis

Los extractos metanólicos de *S. fluitans*, y *S. buxifolium* no son tóxicos en el bioensayo de *A. salina* y presentan actividad ansiolítica y anticonvulsiva en ratón.

4 Objetivos

4.1 Objetivos general

Determinar la toxicidad de los extractos metanólicos de *S. fluitans* y *S. buxifolium* en *A. salina* y evaluar su actividad ansiolítica y anticonvulsiva en ratón.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la CL_{50} de los extractos MeOH de *S. fluitans* y *S. buxifolium* mediante un bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*.
- Establecer el potencial ansiolítico y anticonvulsivo de los extractos MeOH de *S. fluitans* y *S. buxifolium* en modelos farmacológicos en ratón.

5 Metodología

5.1 Material biológico

5.1.1 Colecta y clasificación de especies de *Sargassum*

La colecta de sargazo se realizó mediante buceo en apnea en el puerto de Telchac en el estado de Yucatán, durante los meses de junio, julio y agosto de 2019. La colecta del sargazo estuvo dirigida por el Dr. Emmanuel Hernández Núñez del CINVESTAV - Unidad Mérida. El sargazo se separó en las diferentes algas que lo componen, cada especie fue guardada en bolsas de plástico contra la luz solar y posteriormente se lavaron con agua y se liofilizaron. La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. Luis Alberto Rosado de la Universidad Autónoma de Yucatán. Para este estudio se seleccionaron dos especies *S. fluitans* y *S. buxifolium*.

5.1.2 Preparación de los extractos

Para la preparación de los extractos se colocaron 500 g de cada material vegetal de *S. fluitans* y *S. buxifolium* con 500 mL de metanol (MeOH), se dejaron durante 48 horas y posteriormente se filtraron. Se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio, para eliminar el disolvente. Se pesó el extracto crudo libre de disolvente y se guardó para la evaluación biológica.

5.2 Fármacos y reactivos

La cafeína, el pentilentetrazol y el Tween 20 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); el metanol fue adquirido de Fluka Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); Los huevos de artemia (San Francisco Bay Brand, ASF65031 Brine Shrimp Eggs), el diazepam (Valium, Laboratorios Roche), la permetrina (Frontline, laboratorios Boehringer Ingelheim), la sal marina (Comercial), la solución salina (NaCl 0.9%, laboratorios Pisa), y el pentobarbital (Pisabental, laboratorios Pisa) se adquirieron de manera comercial.

5.3 Animales

En este proyecto se utilizaron como animales de estudio a la *Artemia salina* y ratones Swiss-Webster. Las artemias fueron obtenidas a partir de huevos comerciales y como se indica en la metodología del bioensayo de *Artemia salina*. Los ratones de la cepa *Swiss-Webster* fueron hembras de (20-30 g), proporcionados por el bioterio del CINVESTAV sede Sur, los cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (libre acceso a agua y alimento, temperatura controlada 25°C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno). Cada grupo de evaluación estuvo formado por 6 ratones y al término de cada experimento los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂. Todas las pruebas fueron realizadas siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio. El protocolo fue autorizado por la Secretaria de Investigación y Posgrado (SIP-20196843) como parte del programa especial de Proyectos para la Innovación 2019 en el tema particular de Tecnología para la recolección o aprovechamiento del sargazo.

5.4 Bioensayo en *Artemia salina*

La toxicología es la rama de la farmacología relacionada con los efectos indeseables de las sustancias químicas sobre los sistemas vivos, desde células aisladas hasta seres humanos o ecosistemas complejos (Katzung. et al., 2013). Dentro de los ensayos de toxicidad, se cuenta con nanoensayos, en especies pequeñas, que nos permiten determinar la toxicidad a nivel celular, como lo es la prueba de *Artemia salina*, el cual es un método rápido,

conveniente y asequible (Rajabi et al., 2015). El género *Artemia* sp. Es aceptado como un modelo confiable, para experimentos de toxicidad aguda, ha sido aceptada por la ISO TS 20787 se ha publicado recientemente para estandarizar la nanotoxicidad (Asadi. et al., 2019).

Para determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de los extractos metanólicos de *S. fluitans* y *S. buxifolium* se llevó a cabo el cultivo de *Artemia salina* a partir de huevos liofilizados (Diagrama 1); se utilizó una pecera dividida en fase oscura y fase luminosa por una rejilla, con agua de mar preparada artificialmente (16 g de sal marina en 500 mL de agua embotellada, marca Bonafont®), se colocaron 10 µg de huevos liofilizados en la fase oscura, y se dejaron 48 horas a 26-28°C en incubación para obtener los nauplios. Posteriormente, se tomaron 10 nauplios con ayuda de una pipeta pasteur para colocarlos en un frasco vial de 5 mL, 3 réplicas por cada concentración a evaluar, los cuales se colocaron a exposición del extracto de *S. fluitans* y *S. buxifolium* en concentraciones de 0.1, 1, 10, 100, 300, 1000 y 3000 µg/mL, como control positivo se utilizó permetrina en concentraciones de 0.1, 1, 10, 100, 300, 1000 y 3000 µg/mL, un compuesto altamente tóxico y se realizó un blanco de muestra (solución marina). Después de 24 h de exposición, se contaron los nauplios que sobrevivieron y los que murieron, para determinar la CL₅₀ se realizó un análisis probit (Bustos-Obregón y Vargas, 2010).

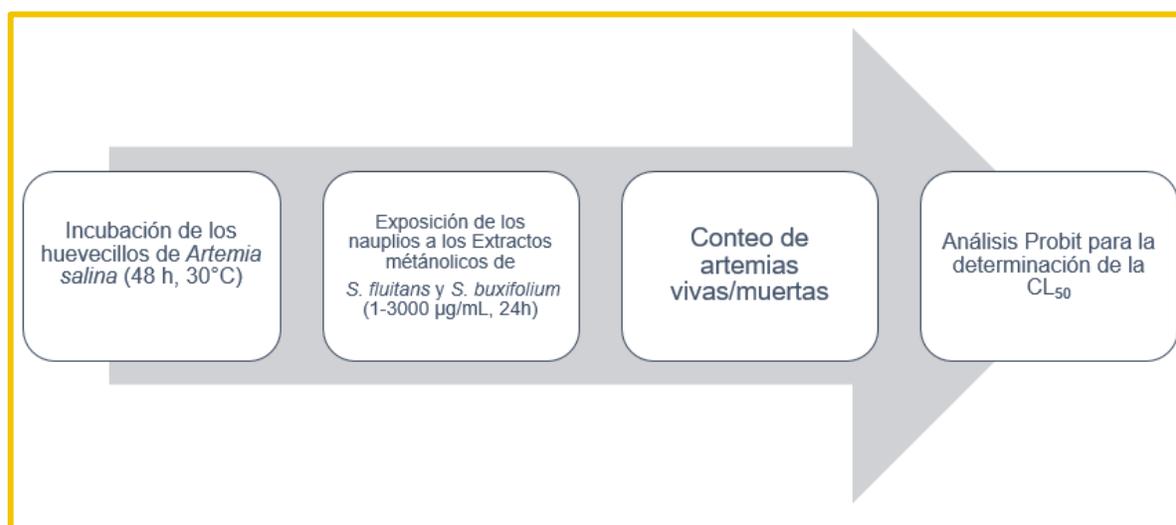


Diagrama 1: Método para la obtención de CL₅₀ del extracto metanólico de *S. fluitans* y *S. buxifolium* mediante un bioensayo de *Artemia salina*.



Diagrama 2. Bioensayo en *Artemia salina*.

Cuando se realizan investigaciones científicas concretas, es necesario eliminar variables que puedan interferir, en este proyecto se emplearán fármacos que nos sirven como control positivo.

Para determinar la toxicidad de los extractos, como control positivo, se empleará Nitrofurantoína, un nitrofurano antibacteriano que se utiliza específicamente para el tratamiento de las infecciones urinarias producidas por gérmenes gram-negativos y por algunos gram-positivo, como mecanismo de acción inhibe la acetil-coenzima A bacteriana, interfiriendo con el metabolismo de los carbohidratos e impidiendo la formación de la pared celular. La actividad antibacteriana de la nitrofurantoína depende de la acidez de la orina. En general, es bacteriostática, pero a altas concentraciones puede ser bactericida frente a determinados microorganismos. Son sensibles a la Nitrofurantoína, los *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* y *Staphylococcus epidermidis*. Los *Enterobacter* y *Klebsiella* requieren dosis más altas y algunas cepas pueden ser resistentes. Se consideran susceptibles a la nitrofurantoína aquellos gérmenes que son inhibidos por concentraciones de hasta 25 µg/mL, mientras que son considerados como resistentes aquellos que requieren concentraciones de 100 µg/mL o más.

5.5 Pruebas de conducta exploratoria

5.5.1 Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto es un espacio en donde el ratón muestra su orientación espacial. En este proyecto se utilizó una caja de acrílico transparente (18 x 27 cm), en la que la base fue dividida en cuadrantes de 9 x 9 cm (Figura 5). En esta prueba se contó el número de cuadros que el ratón cruza en un periodo de tiempo de 2 minutos, siempre y cuando el cuerpo del ratón pasara más de la mitad de un cuadro a otro. También se evaluó el número de veces que el ratón apoya ambas patas delanteras en las paredes de la caja, estas conductas indican que el ratón está explorando el entorno (González-Trujano et al., 2017).



Figura 6. Prueba de campo abierto. El ratón es colocado en una caja de acrílico dividida en 6 cuadrantes. Se cuenta el número de cuadros recorridos y levantamientos durante 2 minutos.

5.5.2 Prueba de tablero perforado

En esta prueba se colocó el ratón en el centro de un tablero perforado abierto (sin paredes laterales), colocado a 20 cm de altura. El tablero se compone de 9 orificios, de 2cm de diámetro, los cuales se encuentran distribuidos en la base a la misma distancia, en esta

prueba se contó el número de veces que el ratón inclina la cabeza a la altura de sus orejas en el orificio durante 2 minutos (Clark et al., 1971).



Figura 7. Prueba de tablero perforado para determinar el efecto sobre la actividad exploratoria en ratones. Se cuenta número de exploraciones durante 2 min.

5.5.3 Prueba del cilindro de exploración

Se utilizó un cilindro de acrílico de (23 cm altura x 17.5 cm de diámetro), el ratón se coloca en el centro del cilindro y se contó el número de veces que el ratón se apoya en sus extremidades delanteras en las paredes del cilindro, la conducta se registró durante 5 minutos (Pérez et al., 2017).



Figura 8. Prueba del cilindro de exploración, se cuenta el número de levantamientos del ratón durante 5 min.

5.5.4 Diseño experimental de las pruebas de conducta exploratoria

Se formaron 11 grupos de ratones, cada uno con seis animales. Todos los ratones fueron pesados y administrados por vía intraperitoneal considerando 0.1 mL por cada 10 g de peso.

A un grupo se le administró solución salina 0.9% como vehículo, a otro grupo se le administró diazepam (2 mg/Kg, i.p) y a otro más, cafeína (10 mg/Kg). Se utilizó diazepam como un fármaco control inhibitorio y cafeína como fármaco control excitatorio. Los extractos metanólicos de *S. fluitans* y *S. buxifolium* se administraron en dosis crecientes (30, 100, 300 y 600 mg/Kg, i.p).

Después de la administración, los ratones pasaron 20 minutos en la caja antes de colocarlos en la caja de campo abierto, el conteo de los cuadrantes y levantamientos se realizó durante 2 min. Posteriormente, los ratones pasaron al tablero perforado en donde se midió la conducta exploratoria durante 2 min y luego se pasaron al cilindro de exploración en donde se contó en número de levantamientos durante 5 min. Es importante mencionar que cada ratón fue evaluado de uno en uno. Se inició con el grupo vehículo, después con el grupo de diazepam y luego el grupo de cafeína. Una vez que se establecieron las conductas de los controles se procedió a la evaluación de los extractos iniciando con la dosis de 30 mg/kg hasta 600 mg/kg. Al finalizar las 3 pruebas los ratones se utilizaron para evaluar la prueba de convulsiones. En el diagrama 3 se muestra el diseño experimental antes descrito.

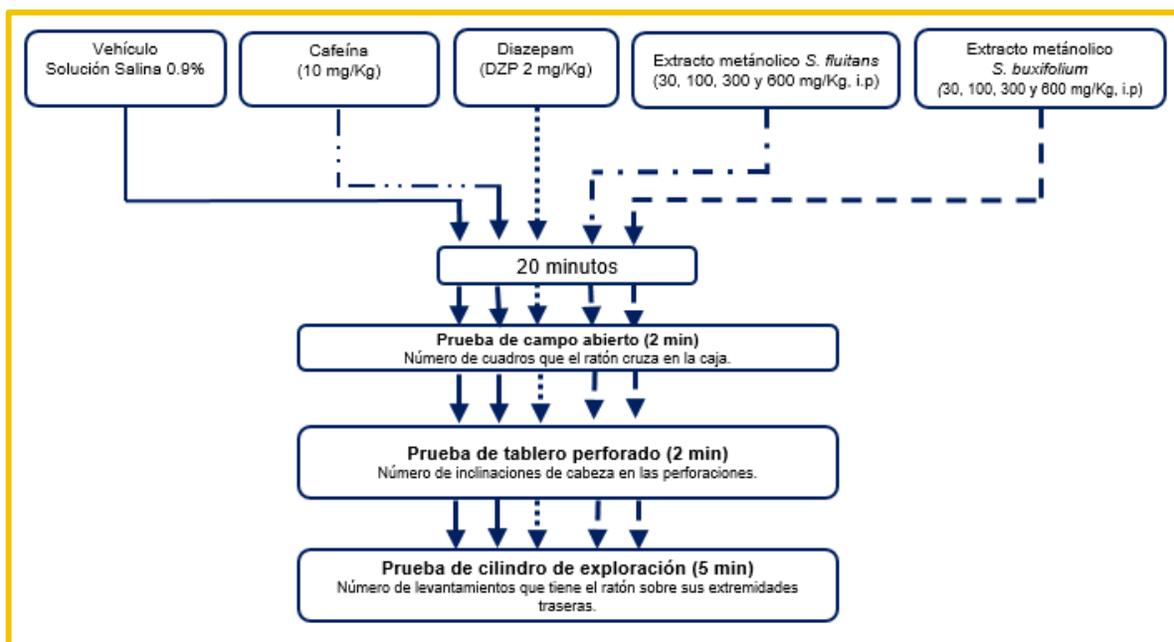


Diagrama 3. Diseño experimental para evaluar la actividad motora en ratones.

5.6 Evaluación de la actividad sedante-hipnótica

Para la evaluación de la actividad de sedación e hipnosis se utilizó la prueba de potenciación del efecto de pentobarbital (Aguirre et al., 2007). Los ratones fueron administrados con solución salina (0.9%), Diazepam (2 mg/Kg, i.p.) y los extractos *S. fluitans* y *S. buxifolium* (30, 100, 300 y 600 mg/Kg, i.p.), 30 min después se les administró pentobarbital sódico (42 mg/kg i.p.). Se registraron tres conductas; latencia de sedación, cuando el ratón comenzó a perder la coordinación motora; latencia de hipnosis, cuando el ratón perdió el reflejo de enderezamiento y; la duración de la hipnosis, cuando el ratón logró enderezarse de nuevo. En la Figura 8, se muestran las fases de sedación-hipnosis antes descritas.

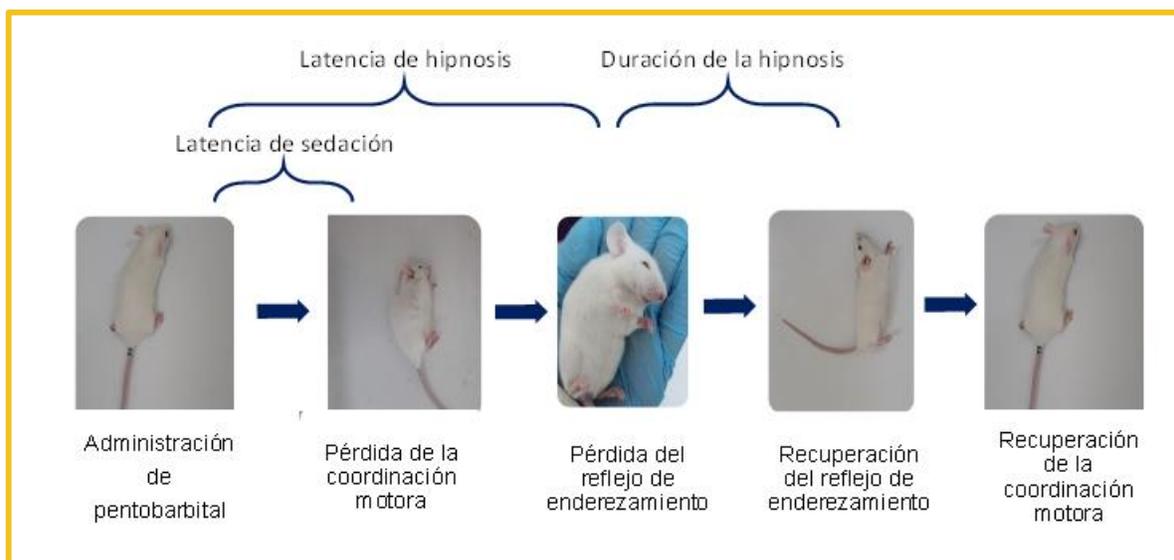


Figura 9. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica.

5.7 Evaluación de la actividad anticonvulsiva

Para medir el efecto anticonvulsivo se utilizó como modelo de convulsión la administración de Pentilentetrazol (PTZ). Los ratones fueron administrados con solución salina (0.9%), Diazepam (1 mg/Kg, i.p) y los extractos de *S. fluitans* y *S. buxifolium* (30, 100, 300 y 600 mg/Kg, i.p), 30 minutos después de haber sido administrados los ratones recibieron una inyección de PTZ (90 mg/Kg i.p). Inmediatamente se colocaron en una caja convencional de acrílico, y se determinó la latencia de la primera convulsión clónica (primer movimiento de oreja/cabeza del ratón), tónica (rigidez muscular) y muerte. Se consideró un tiempo de corte de 30 min, es decir, si el animal no muere en 30 min se sacrifica y se considera que previene las convulsiones, este tiempo fue establecido con respecto al ensayos previos con diazepam (Wang, 2014).

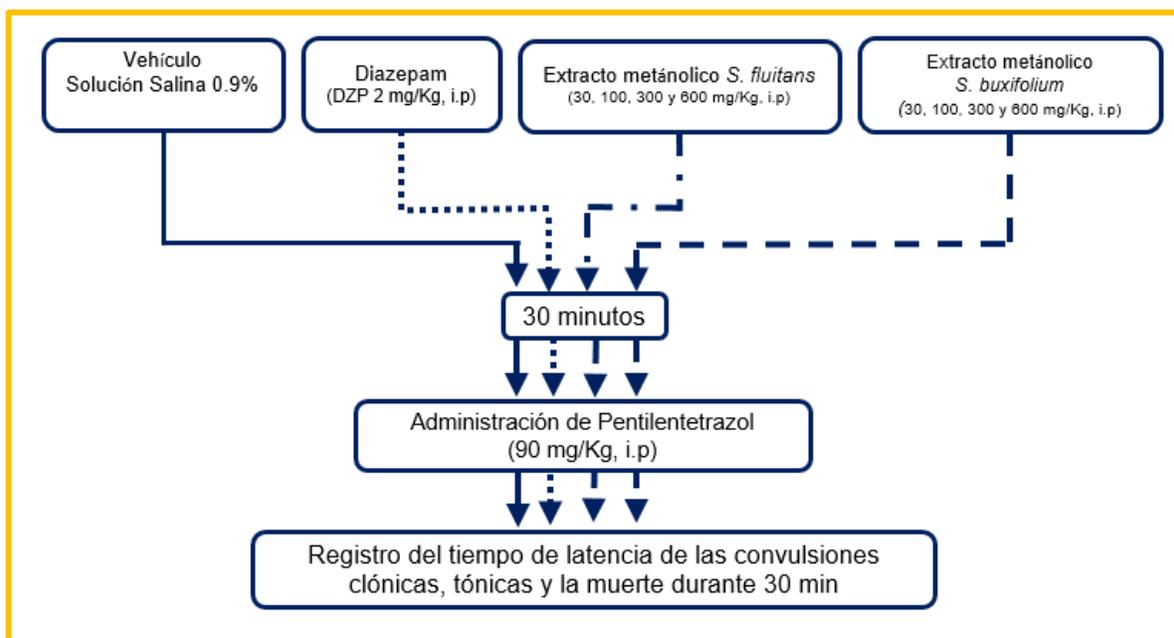


Diagrama 4. Diseño experimental para evaluar la actividad anticonvulsiva en ratones mediante la administración de PTZ.

Como fármacos de referencia se utilizó Diazepam, la cual es una benzodiazepina oral y parenteral de acción prolongada, se usa por vía oral para el tratamiento a corto plazo de los trastornos de ansiedad, como relajante del músculo esquelético. Por vía parenteral está indicado como un agente contra la ansiedad, como anticonvulsivo, sedante, inductor de una anestesia complementaria, como tratamiento para la abstinencia de alcohol. Adicionalmente, posee actividad hipnótica, anticonvulsivante, sedante, relajante muscular y amnésica, las benzodiazepinas como mecanismo de acción actúa incrementando la actividad del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Un neurotransmisor inhibitor que se encuentra en el cerebro, al facilitar su unión con el receptor GABAérgico.

Para inducir de forma química las convulsiones se utilizará pentilentetrazol (PTZ), el cual es un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A, la mayoría de las evidencias indican que el PTZ interacciona con el sitio de unión a picrotoxina en el receptor GABA_A bloqueando el canal de Cl⁻. Aunque el efecto del PTZ en el cerebro es inespecífico, se sugiere que la expresión de las crisis inducidas por este fármaco, este mediada por estructuras cerebrales como la neocorteza, mientras que la extensión tónica se modula en regiones del diencefalo y el tallo cerebral, incluyendo la formación reticular, el bulbo y la sustancia gris central (Ramos-Morales, et al., 2012)

También se utilizó cafeína como fármaco de referencia ya que es un alcaloide que está presente en más de 60 especies de plantas, su estructura molecular pertenece a un grupo de xantinas trimetiladas con sus compuestos íntimamente relacionados: teobromina (presente en el cacao) y la teofilina (presente en el té). Químicamente, esos alcaloides se parecen a las purinas, xantinas y al ácido úrico, que son compuestos metabólicamente importantes, es absorbida por el tracto gastrointestinal de forma rápida y presenta una biodisponibilidad del 100%, es un estimulante del sistema nervioso central, aumentando el 3,5-AMP-cíclico por la inhibición de la fosfodiesterasa. Así aumenta la sensibilidad del centro respiratorio bulbar al dióxido de carbono, estimula el impulso respiratorio central y aumenta la contracción de la musculatura esquelética, mejorando la contractilidad diafragmática. (Tavares-Sakata, 2012).

5.8 Análisis de Resultados

5.8.1 Cálculo de la CL₅₀ por el método Probit

El modelo probit es un tipo de regresión donde la variable dependiente puede tomar solo dos valores, de todo o nada. Específicamente en el bioensayo de *Artemia salina* estos valores son de muerte o no muerte. La palabra probit es un acrónimo, viene de probabilidad + unit (unidad). El propósito del modelo es estimar la probabilidad de que una observación con características particulares caerá en una categoría específica; Además, clasificando las observaciones basadas en sus probabilidades predichas es un tipo de modelo de clasificación binario.

Un modelo probit es una especificación popular para un modelo de respuesta ordinal o binario. En donde se emplea una función de enlace probit, se suele estimar utilizando el procedimiento estándar de máxima verosimilitud, que se denomina una regresión probit.

A continuación, se muestran los cálculos para determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) mediante una regresión probit.

Considerando la viabilidad de artemias en diferentes concentraciones; se tiene que cada concentración fue evaluada con varias repeticiones, en donde r_i es el número de individuos muertos y n_i el número total de individuos por cada repetición.

1.- Calcular P_i , para cada repetición en el experimento;

$$P_i = \frac{r_i}{n_i}$$

2.- Con la finalidad de eliminar la participación del vehículo, en cada repetición se tiene un grupo control y se hace una corrección de acuerdo a la fórmula de Abbott;

$$P_i \text{ corregida} = \frac{P_i \text{ prueba} - P_i \text{ control}}{1 - P_i \text{ control}}$$

3.- Posteriormente se hace la corrección de Miller-Tainter, cuando P_i es igual a 0 a la concentración más alta y cuando P_i es igual a 1, a la concentración más baja;

$$P_i \text{ corregida} = \frac{0.5}{n_i}$$

$$P_i \text{ corregida} = \frac{n_i - 0.5}{n_i}$$

4.- Se calculan las unidades probit (Y_i), con la fórmula:

$$Y_i = Z_i + 5$$

Donde Z_i es el área de acuerdo a la curva normal estándar.

5.- Se realiza una regresión lineal del logaritmo de la concentración (X_i) vs Y_i . Se calcula la pendiente (β) y la ordenada al origen (α) y procedemos a calcular la CL_{50} con la siguiente fórmula:

$$CL_{50} = 10^{\frac{5-\alpha}{\beta}}$$

Adicionalmente se pueden establecer los límites de confianza calculando la CL_{84} y la CL_{16} , con las siguientes fórmulas:

$$CL_{84} = 10^{\frac{5.99-\alpha}{\beta}}$$

$$CL_{16} = 10^{\frac{4.01-\alpha}{\beta}}$$

Se determina la desviación estándar (S) con la siguiente fórmula:

$$S = \frac{CL_{84} - CL_{16}}{2}$$

Y el Error Estándar de la Media (EEM):

$$EEM = \frac{2S}{\sqrt{2N'}}$$

Donde N' es el número de unidades experimentales entre $P_i=0.07$ y $P_i=0.93$

Finalmente se establece el valor de t de la prueba estadística *T de Student* para calcular los límites de confianza inferior y superior:

$$t_{(\alpha=0.05, gl=N-2)}$$

LIC= Límite inferior confiable

$$LIC = CL_{50} - (t_{(\alpha=0.05, gl=N-2)} * EEM)$$

LSC= Límite superior confiable

$$LSC = CL_{50} + (t_{(\alpha=0.05, gl=N-2)} * EEM)$$

Entonces se puede reportar la CL_{50} o el intervalo de confianza 95 (IC_{95}):

$$CE_{50} = CL_{50} \pm EEM \text{ mg/mL}$$

$$IC_{95} = (LIC - LSC) \text{ mg/mL}$$

5.8.2 Análisis de pruebas conductuales

Todos los datos obtenidos se expresan como el promedio de 6 animales \pm el error estándar medio (e.e.m.). Para determinar diferencias estadísticas significativas se utilizó un análisis de varianza (ANOVA, una vía), para verificar la normalidad de los grupos. Posteriormente, se utilizó una prueba post-hoc de prueba de Dunnett.

6 Resultados

6.1 Bioensayo de *Artemia salina*

En el bioensayo de *Artemia salina* se determinó la letalidad de los extractos metanólicos de *S. buxifolium* y *S. fluitans* a diferentes concentraciones logarítmicas (0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 3000 $\mu\text{g/mL}$). Como control positivo se utilizó como fármaco de referencia a la permetrina (0.01 $\mu\text{g/mL}$ a 3000 $\mu\text{g/mL}$). En el apartado 5.8 Análisis de resultados, se describe el método por el cual se estableció la CL_{50} . La permetrina es un compuesto altamente tóxico, se determinó su CL_{50} y fue de 0.15686933 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de los extractos evaluados ninguno de éstos presentó toxicidad, por lo que se clasificaron sin toxicidad.

6.2 Evaluación de la actividad motora

6.2.1 Prueba de campo abierto

En la prueba de campo abierto se registró el número de plazas exploradas de cada ratón durante un periodo de 2 minutos. Los ratones fueron administrados con el vehículo (solución salina 0.9%, i.p.), diazepam (2 mg/kg, i.p.) y cafeína (10 mg/kg, i.p.). En el panel A de la figura 9, se observa que la administración de diazepam disminuye 69.29% el número de cuadros explorados y la administración de cafeína los incrementa 20.08%, en ambos casos la diferencia con respecto al vehículo es estadísticamente significativa (ANOVA, una vía y post hoc de Dunnett). Esto se debe a que diazepam es un fármaco depresor del SNC y cafeína es un estimulante del SNC.

Cuando se administró el extracto metanólico de *S. buxifolium* (30-600 mg/kg, i.p.) a los ratones, éstos mostraron una disminución gradual del número de cuadros explorados, a la dosis de 100 mg/kg se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto

al vehículo. La movilidad entre los cuadros explorados disminuyó hasta 77% con la dosis de 600 mg/kg con respecto al vehículo (Figura 9A).

En el caso del extracto *S. fluitans* se observa en la figura 10A un efecto dependiente de la concentración obteniéndose una inhibición del número de cuadros explorados hasta de 71.66% con la dosis de 600 mg/kg con respecto al vehículo (ANOVA, una vía y post hoc de Dunnett).

6.2.2 Levantamientos en caja de exploración

En la prueba de campo abierto, además de contar el número de cuadros, también se evaluó el número de levantamientos que el ratón realiza mientras explora la caja de acrílico. En el panel B de la figura 8 se observa que después de administrar diazepam (2 mg/kg, i.p.) hay una disminución estadísticamente significativa del número de levantamientos, estos decrecen hasta 87.43%, con respecto al vehículo. Cuando se administró cafeína se observó un incremento en el número de levantamientos y aunque no se encontró una diferencia estadística con respecto al vehículo si se pudo observar un incremento de la conducta.

La administración de *S. buxifolium* (30-600 mg/kg, i.p.) generó una disminución dependiente de la dosis del número de levantamientos, a partir de la dosis de 100 mg/kg se observa diferencia estadística significativa ($P \leq 0.01$) y el máximo efecto obtenido fue una reducción 77.97 % con la dosis de 600 mg/kg.

En el panel B de la figura 10 se observa una disminución del número de levantamientos cuando se administró *S. fluitans*, a partir de la dosis de 30 mg/kg se observó un 22.82% de disminución. Y a la dosis más alta evaluada de 600 mg/kg se presentó en un 88.99% de disminución de la actividad, en todos los casos hubo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo ($P \leq 0.01$).

6.2.3 Prueba de tablero perforado

En la prueba de tablero perforado, se cuantificó el número de veces que los ratones exploran las perforaciones, inclinando su cabeza hacia el fondo del orificio del tablero. La

administración de diazepam (2 mg/kg, i.p.) disminuyó el número de exploraciones del ratón en un 75.63% con respecto al vehículo, este valor fue estadísticamente significativo. Cuando se administró cafeína no se pudo observar diferencia estadística con respecto al vehículo.

La administración del extracto metanólico de *S. buxifolium* en los ratones no disminuyó el número de observaciones en el tablero hasta las dosis más altas evaluadas; así, la dosis de 300 mg/kg disminuyó en 49.63% y la dosis de 600 mg/kg un 66.9% (Figura 9C).

En la Figura 10C se muestra que cuando se administró el extracto *S. fluitans* en los ratones se observó una disminución desde la dosis de 30 mg/kg, en la dosis de 300 mg/kg se ve el efecto máximo (disminuyendo un 80.32%) un efecto similar al que genera diazepam (disminución del 75.59%).

6.2.4 Prueba del cilindro de exploración

Se utilizó un cilindro de acrílico para determinar cuántas veces el ratón se apoyaba sobre las patas traseras durante 5 minutos. En esta prueba la administración de diazepam disminuyó al 100% el número de levantamientos con respecto al vehículo. La administración de cafeína no modificó el número de levantamientos con respecto al control.

La administración del extracto de *S. buxifolium* disminuyó significativamente el número de levantamientos a la dosis de 30 mg/kg, pero las siguientes dosis 100 (83.79%), 300 mg/kg (86.36%) y 600 mg/kg (91.48%), redujeron considerablemente la actividad.

En el panel D de la Figura 10, se observa muy interesantemente que la administración del extracto de *S. fluitans* presenta una disminución del número de levantamientos totalmente al igual que la administración de diazepam y es que a la dosis de 300 mg/kg disminuyó el 100 % de la actividad con respecto al vehículo.

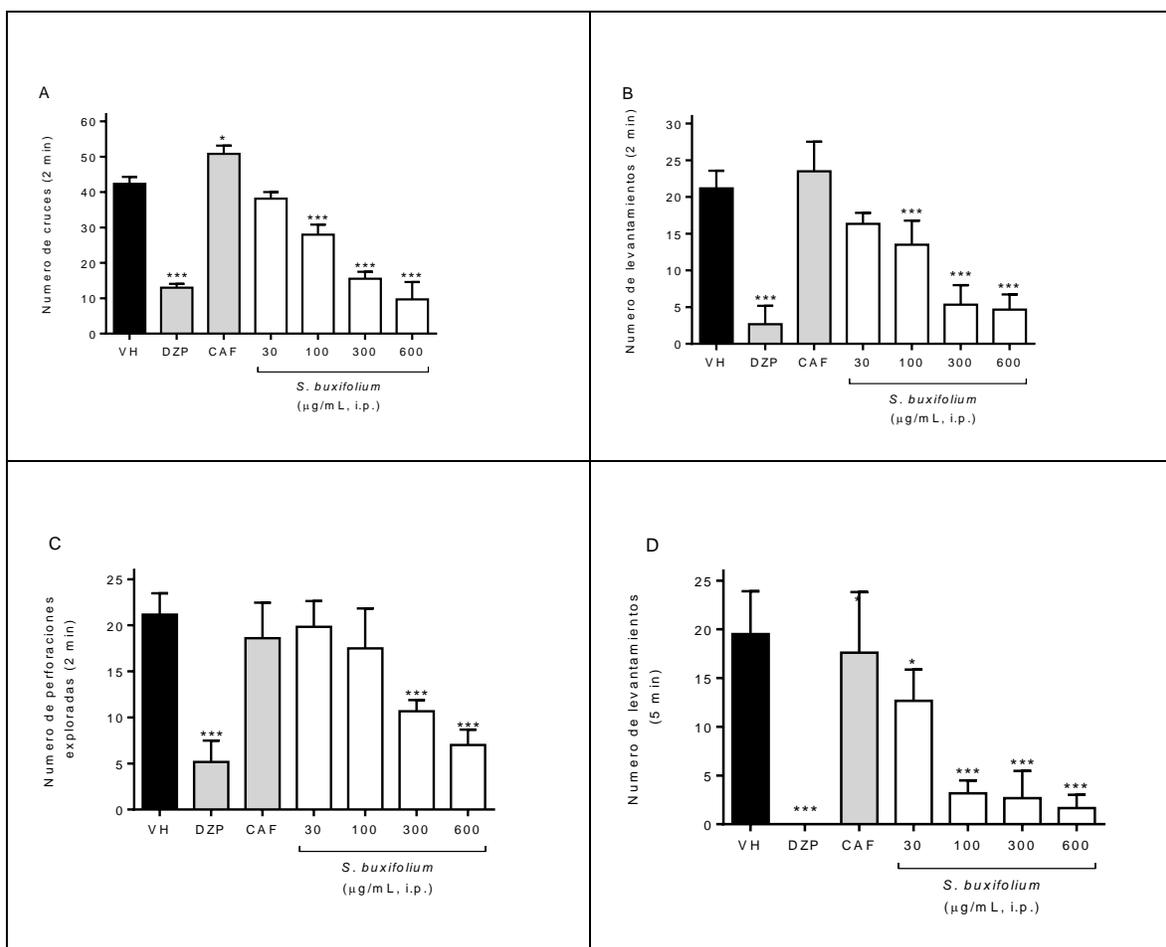


Figura 10. A. Prueba de campo abierto. B. Levantamientos en la caja de exploración. C. Prueba de Tablero perforado. D. Número de levantamientos en cilindro de exploración después de la administración del vehículo (solución salina 0.9%, V), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.), cafeína (10 mg/Kg), *S. buxifolium* (30-600 mg/kg, i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e.m. *Estadísticamente diferente con respecto al vehículo *** $p < 0.001$, utilizando una ANOVA de 1 vía con una prueba de Dunnett.

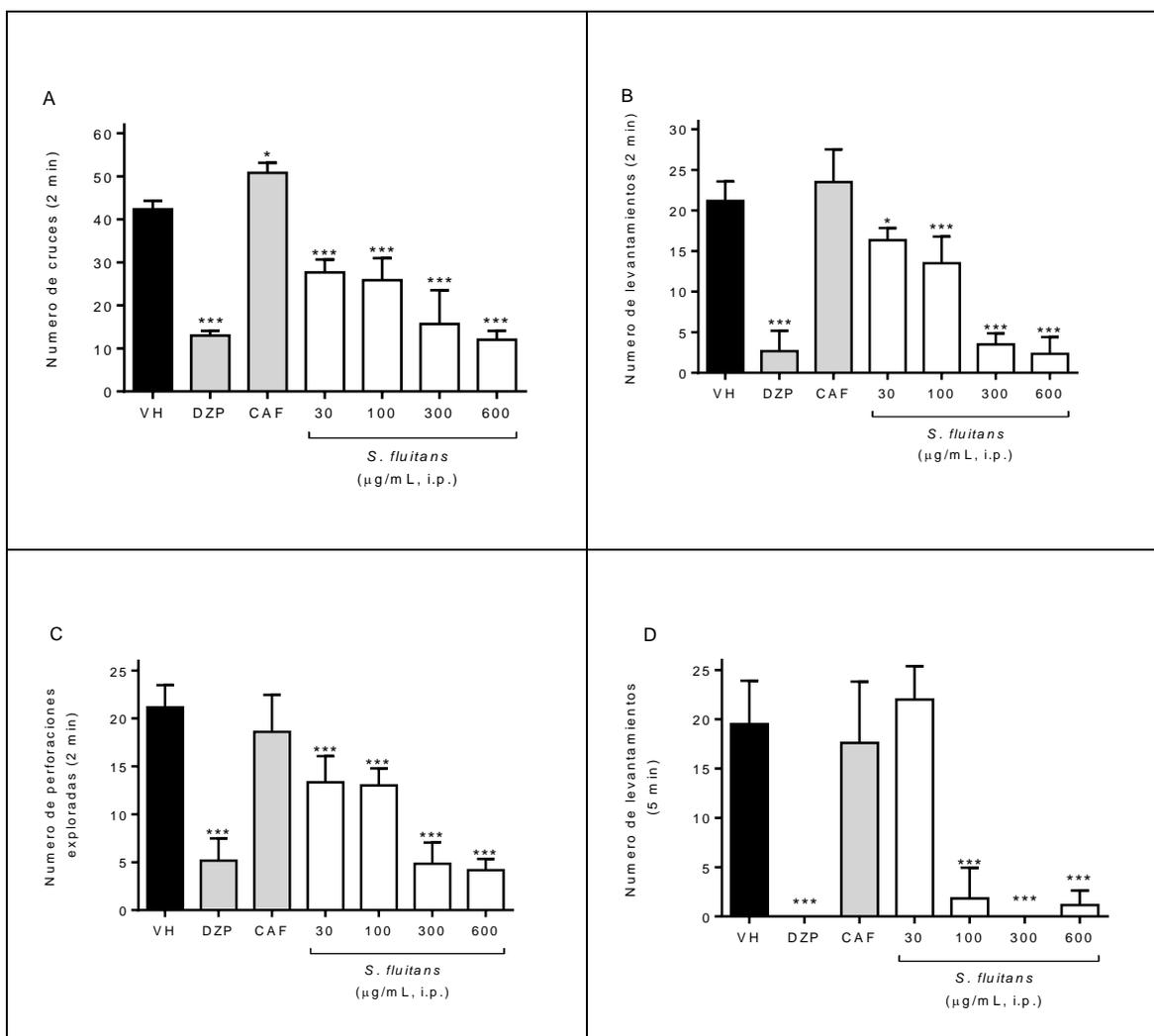


Figura 11. A. Prueba de campo abierto. B. Levantamientos en la caja de exploración. C. Prueba de Tablero perforado. D. Número de levantamientos en cilindro de exploración después de la administración del vehículo (solución salina 0.9%, V), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.), cafeína (10 mg/Kg), *S. fluitans* (30-600 mg/kg, i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e.m. *Estadísticamente diferente con respecto al vehículo *** $p < 0.001$, utilizando una ANOVA de 1 vía con una prueba de Dunnett.

6.3 Evaluación de la actividad anticonvulsivante

En esta prueba, para medir la actividad anticonvulsiva se utilizó pentilentetrazol para inducir las convulsiones, se midió la latencia de mioclonias y convulsiones tónicas, obteniendo una

mortalidad de 6/6 en vehículo y ambos extractos. Sin embargo, para la dosis de 300 mg/kg de *S. fluitans*, que se observa en la Tabla 5, pudiera retrasar la presencia de mioclonias y convulsiones tónicas con respecto al vehículo, pero al aumentar la dosis se demuestra que no es posible esta actividad. Sin embargo, al tratarse de un extracto, es importante tener presente esta actividad, ya que podría algún componente de este ser el que provoque este resultado.

Tabla 5. Efecto de la actividad anticonvulsiva de *S. buxifolium* y *S. fluitans*

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (min)		Mortalidad
		Mioclónica	Tónicas	
Veh	----	0.77 ± 0.05	2.03 ± 0.38	6/6
DPZ	2	----	-----	0/6
<i>Sargassum buxifolium</i>	30	0.61 ± 0.05	2.29 ± 0.52	6/6
	100	0.69 ± 0.05	2.92 ± 0.68	6/6
	300	0.66 ± 0.04	2.22 ± 0.21	6/6
	600	0.57 ± 0.02	1.54 ± 0.21	6/6
<i>Sargassum fluitans</i>	30	0.61 ± 0.01	2.86 ± 1.27	6/6
	100	0.70 ± 0.03	7.91 ± 0.97	6/6
	300	0.95 ± 0.05	8.59 ± 3.66	6/6
	600	0.63 ± 0.03	1.98 ± 0.40	6/6

Los datos representan el promedio de la actividad anticonvulsiva de 6 animales ± e.e.m. después de la administración del vehículo (solución salina 0.9%), diazepam (DPZ, 2 mg/kg, i.p.), *S. buxifolium* (30-600 mg/kg, i.p.) y *S. fluitans* (30-600 mg/kg, i.p.) sobre la latencia de las convulsiones mioclónicas, tónicas y la mortalidad.

6.3.1 Evaluación de la actividad sedante-hipnótica

Para evaluar esta actividad, se utilizó la prueba de la potenciación del efecto de pentobarbital para inducir la hipnosis, se midió la latencia de sedación, hipnosis y la

duración de hipnosis, como se muestra en la Tabla 6, el grupo del vehículo tuvo una duración de hipnosis de 33.6 minutos en promedio, y se puede observar que no hay actividad en los extractos, ya que no hay una diferencia significativa, como, en el caso de diazepam, que al ser un depresor del SNC como el pentobarbital, se ve un efecto potenciado ya que la hipnosis que inducen duró en promedio 144.5 minutos.

Tabla 6. Efecto de la actividad sedante-hipnótica de *S. buxifolium* y *S. fluitans*

Grupo	Dosis (mg/Kg)	Latencia (min)		Duración de la hipnosis (min)
		Sedación	Hipnosis	
Veh	----	1.71 ± 0.01	0.75 ± 0.06	33.6 ± 3.94
DPZ	2	1.71 ± 0.06	0.58 ± 0.08	144.5 ± 12.28
<i>Sargassum buxifolium</i>	30	1.80 ± 0.14	1.18 ± 0.05	49.33 ± 5.48
	100	1.86 ± 0.03	1.27 ± 0.15	42.50 ± 2.42
	300	1.70 ± 0.03	1.09 ± 0.05	62.24 ± 4.92
	600	1.80 ± 0.12	1.50 ± 0.26	51.33 ± 3.46
	30	1.62 ± 0.08	0.52 ± 0.10	33.75 ± 3.49
<i>Sargassum fluitans</i>	100	1.77 ± 0.03	0.69 ± 0.07	31.54 ± 3.36
	300	2.01 ± 0.09	0.76 ± 0.13	44.75 ± 4.39
	600	1.67 ± 0.20	1.09 ± 0.11	52.78 ± 5.77

Los datos representan el promedio de la actividad sedante-hipnótica de 6 animales ± e.e.m. después de la administración del vehículo (solución salina 0.9%), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.), *S. buxifolium* (30-600 mg/kg, i.p.) y *S. fluitans* (30-600 mg/kg, i.p.) sobre la latencia de sedación e hipnosis y a la duración de la hipnosis.

7 Discusión de resultados

En el presente proyecto se propuso evaluar la posible actividad ansiolítica o anticonvulsiva de dos especies de *Sargassum*, con la finalidad de establecer un potencial terapéutico para

el sargazo, material vegetal, que literalmente ha inundado el caribe mexicano. Además de evaluar la toxicidad de los extractos.

Los primeros experimentos que se hicieron se centraron en explorar un posible efecto citotóxico por parte de los extractos de algas. El bioensayo de *A. salina* se utiliza como bioindicador de toxicidad, sobre todo para explorar como los contaminantes en aguas residuales afectan a los organismos acuáticos. Se seleccionó este modelo porque la *A. salina* vive en aguas superficiales y proporciona nutrición a otros organismos. En las evaluaciones realizadas se demostró que *S. buxifolium* y *S. fluitans* no generaron toxicidad en el crustáceo de *A. salina*. De acuerdo con reportes previos, una concentración mayor a 1000 µg/mL no tiene interés biológico como marcador de daño (Déciga-Campos et al., 2007). Así, ambos extractos metanólicos de *Sargassum* fueron considerados de nula letalidad de acuerdo con los criterios de toxicidad de la (OECD) (Walum 1998).

Con los resultados obtenidos se sugiere que los extractos metanólicos de *S. buxifolium* y *S. fluitans* podrían tener actividad ansiolítica. Ya que la administración oral de los extractos a ratones disminuye la actividad locomotora en dos pruebas de campo abierto y una prueba en un ambiente cerrado. Las pruebas que se utilizaron fue una caja de acrílico y un tablero perforado que representan un campo abierto (open field, en inglés) y la actividad en un cilindro de acrílico que corresponde al espacio cerrado. Tanto en condiciones naturales como de laboratorio, las ratas y ratones al encontrarse en un ambiente nuevo de forma espontánea tienen un comportamiento característico de explorar ambientes nuevos, manifiestan también un comportamiento defensivo que refleja la ansiedad o miedo en los animales.

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que ambos extractos metanólicos de *S. buxifolium* y *S. fluitans* disminuyen de forma gradual el número de cuadros explorados, el número de levantamientos y el número de perforaciones exploradas. Con estos resultados se puede concluir que los extractos presentan un efecto ansiolítico dependiente de la dosis.

Los modelos preclínicos utilizados para evaluar el efecto ansiolítico son pruebas sencillas, rápidas, económicas y que pueden brindar resultados confiables (Walsh y Cummins; 1976). En el modelo de campo abierto se evalúa una conducta de un ambiente desconocido; una vez que se coloca al animal en un ambiente nuevo, este tiende a explorar y se mueve en

dirección hacia el centro en la nueva área asignada. También intenta salir del nuevo medio, por ello realiza los levantamientos. Se ha establecido que esta prueba permite determinar una conducta ansiolítica, debido a que un animal tranquilo disminuye la actividad exploratoria (González Trujano, 2017). En algunos estudios también se cuenta la latencia de la permanencia del ratón en la parte central del campo abierto, entre menor sea la latencia en llegar a la parte central se atribuye a un mayor efecto ansiolítico (Calabrese, 2008; Pérez-Ortega, 2017; González Trujano, 2017). En el caso del tablero perforado se han propuesto algunas variantes y algunos autores utilizan modelos de tableros de 4 perforaciones y otros cuentan toda la trayectoria del ratón mediante el movimiento del animal medio de sensores con un mecanismo infrarrojo (Fernández, 2006). El efecto observado en el campo abierto se ha correlacionado también con la prueba del cilindro; el cilindro es un espacio cerrado en donde el ratón trata de escapar, pero si tiene un fármaco que disminuya su actividad o lo tranquilice, este disminuirá el número de levantamientos, así en las tres pruebas se puede tener una disminución de la actividad motriz vinculada a un efecto ansiolítico (Pérez-Ortega et al., 2017).

Estos modelos de ansiedad han sido utilizados en evaluaciones previas en donde se ha demostrado que algunos extractos de plantas medicinales disminuyen la actividad locomotora; como el aceite de lavanda (Kumar, 2013), el extracto acuoso y etanólico de *Tagetes erecta* (Pérez-Ortega, 2017), el extracto de acetato de etilo de *Lippia graveolens* (González-Trujano et al., 2017) y el extracto de *Brickellia cavanillesii* (Ávila Villareal). Así como algunos metabolitos como la naringenina y su glucósido (naringina) (Fernández et al. 2006). La actividad de estos extractos se ha atribuido a la activación del sistema de neurotransmisión GABAérgica (González-Trujano et al., 2017).

La expresión de la ansiedad implica una actividad coordinada de numerosas vías cerebrales que involucran diferentes neurotransmisores, todos los cuales interactúan y son modulados por papeles sinápticos locales y distantes. El papel del neurotransmisor inhibitor GABA se ha considerado durante mucho tiempo como fundamental para la regulación de la ansiedad y este sistema de neurotransmisores es el objetivo de las benzodiazepinas y los fármacos relacionados utilizados para tratar los trastornos de ansiedad. No obstante, debe reconocerse que el GABA no es el único neurotransmisor importante en la modulación de las respuestas de ansiedad en la amígdala, y se han implicado muchos otros neurotransmisores, como la serotonina (Gordon et al., 2004; Durant et al., 2010) péptidos

opioides (Van't Veer et al., 2013) endocannabinoides (Hill et al., 2009; Ruehle et al., 2012), oxitocina (Neumann et al., 2012), hormona liberadora de corticotropina y neuropéptido Y (Thorsell et al., 2010).

Por lo anterior, es importante mencionar que en muchas de las evaluaciones a nivel preclínico de posibles tratamientos para la ansiedad se utiliza el diazepam como fármaco prototipo. Se ha demostrado que el diazepam disminuye la conducta de campo abierto y del cilindro. El resultado obtenido coincide con reportes previos en donde se ha establecido que las benzodiazepinas como el fluracepam, oxacepam y diazepam muestran una disminución de la conducta en las pruebas antes mencionadas (Calabrese, 2008; Pérez-Ortega et al., 2017).

Se ha establecido que las benzodiazepinas como el diazepam son moduladores alostéricos de las subunidades α que confieren sensibilidad al receptor GABA. El GABA se une dentro de la interfaz entre las subunidades α y β ; dado que hay dos pares de subunidades α y β en cada receptor, dos moléculas de GABA se unen a cada receptor y, por lo tanto, permite una cooperación positiva en la activación de la conductancia del cloruro, lo que transmite una alta sensibilidad a la respuesta. Así, las benzodiazepinas como el diazepam y moléculas afines se unen dentro de la interfaz entre las subunidades α y γ , y su unión aumenta la probabilidad de apertura del canal en respuesta a GABA (Sigel y Luscher, 2007). A través de este mecanismo, las benzodiazepinas facilitan la inhibición GABAérgica. La afinidad de las benzodiazepinas por el receptor GABA_A está determinada por la naturaleza de las subunidades α y γ , y dado que los receptores GABA_A en diferentes regiones del cerebro tienen diferentes estructuras de subunidades, su sensibilidad a los moduladores alostéricos varía (Sigel y Luscher, 2007). También se ha demostrado que agonistas como el muscimol y el ácido amino-oxiacético o inhibidores del catabolismo de GABA como el valproato de sodio disminuyen la actividad locomotora, por lo que se propone que la neurotransmisión GABAérgica debe estar vinculada a la disminución de la actividad locomotora (Calabrese 2008). El hecho de que los extractos hayan disminuido la conducta al de forma dependiente de la dosis como el diazepam sugeriría la posible participación de algunos de sus componentes en este tipo de receptor. Sin embargo, se requieren de más estudios que permitan confirmar esta hipótesis.

Es importante resaltar que las diferentes subunidades α del receptor GABA muestran patrones de expresión anatómicamente específicos en el SNC, con circuitos neuronales funcionalmente diferentes que expresan receptores GABA_A de composiciones específicas de subunidades α . Esta diferenciación se observa entre regiones cerebrales, entre diferentes compartimentos subcelulares (por ejemplo, presináptico vs postsináptico, somático vs dendrítico) e incluso entre sinapsis individuales de la misma neurona (Sieghart et al., 2002). Esta heterogeneidad estructural sugiere que las diferentes subunidades α pueden conferir diferentes funciones conductuales y por tanto, pueden constituir blancos terapéuticos específicos (Sigel y Luscher, 2011). Se ha dedicado mucho esfuerzo a adaptar la selectividad de las moléculas que se dirigen a estos receptores con el fin de desarrollar medicamentos más eficaces o evitar efectos secundarios no deseados como la sedación o la dependencia. A este respecto, se ha sugerido, por ejemplo, que la relativa especificidad para los receptores GABA_A que contienen $\alpha 1$ del fármaco hipnótico zolpidem puede explicar su relativa falta de efectos miorelajantes (Korpi et al., 1997). Se ha establecido por ejemplo que la subunidad $\alpha 2$ es particularmente relevantes para las manifestaciones de ansiedad (Löw et al., 2000; Mohler, 2002).

Adicionalmente, se ha establecido que las moléculas pequeñas que promueven selectivamente la síntesis de neurosteroides dentro del SNC o imitan la acción de los neurosteroides en los receptores GABA_A pueden ser más prometedoras para determinar un efecto ansiolítico (Nothdurfter et al., 2012). Por ejemplo, la etifoxina, es una molécula pequeña estructuralmente no relacionada con las benzodiazepinas que demuestra efectos ansiolíticos en animales de experimentación (Poisbeau et al., 2018) y ejerce un efecto modulador de la acción de los neurosteroides. Los ensayos clínicos aleatorizados que comparan etifoxina con buspirona, sulpirida o lorazepam han demostrado la eficacia de este agente en pacientes con trastorno de adaptación (Servant et al., 1998; Nguyen et al., 2006). Además, en comparación con lorazepam, la etifoxina tiene efectos sedantes relativamente bajos y se asocia con menos deterioro de la memoria e interferencia con la función neuropsicológica (Micallef et al., 2001). Así los extractos de *S. buxifolium* y *S. fluitans* podrían tener componentes que pudieran también interactuar como los neurosteroides en el receptor GABA.

El efecto tranquilizante del extracto metanólico de *S. Buxifolium* y *S. fluitans* podría también ser considerado como un efecto de sedación ya que hay una disminución de la actividad

locomotora debido a una inhibición general en el sistema nervioso central. Por ello en el presente proyecto se evaluó la actividad sedante-hipnótica de ambos, midiendo el tiempo de latencia de sedación y el tiempo de hipnosis o sueño inducido por pentobarbital, (González-Trujano, 2017; Usami, 1999; Deng, 2018) obteniendo que las especies de *Sargassum* no tienen un efecto sedante-hipnótico significativo. Esta prueba se estableció como complementaria al efecto ansiolítico ya que se ha establecido que algunos extractos tienen actividad depresora del SNC cuando hay disminución de actividad en las pruebas de campo abierto correlacionado con el efecto sedante (González-Trujano et al., 2017). Sin embargo, no es este el caso ya que los extractos no mostraron actividad sedante.

Para la evaluación de la actividad anticonvulsiva se indujeron convulsiones con Pentilentetrazol (PTZ), vía i.p., (Aricioglu et al., 2003) algunos autores manejan otra vía de administración como la subcutánea (Usami, 1999), de acuerdo a los resultados obtenidos, la latencia de las convulsiones no fue significativa del grupo control, con la administración de PTZ, excepto la dosis de 300mg/Kg de *S. fluitans* que aparentemente podría retrasar la presencia de convulsiones, por lo tanto, no se considera que tengan un efecto dependiente de la dosis.

8 Conclusión

En el presente proyecto se concluye que los extractos metanólicos de *S. fluitans* y *S. buxifolium* no son tóxicos, en el bioensayo de *Artemia salina*, de acuerdo a los criterios de la OECD. También, se sugiere que *S. buxifolium* y *S. fluitans* pueden tener un efecto ansiolítico. La evaluación preliminar de ambas especies de sargazo permitió establecer que no tiene un efecto sedante-hipnótico ni anticonvulsivo. Por lo que en futuras investigaciones se sugiere investigar el mecanismo a nivel del sistema GABAérgico de los extractos evaluados para confirmar su efecto ansiolítico.

9 Referencias bibliográficas

1. Aguirre-Hernández E, Martínez AL, González-Trujano ME, Moreno J, Vibrans H, Soto-Hernández M. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *J Ethnopharmacol*, 2007;109(1):140-145. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.017> .
2. Alba-Betancourt C, Sánchez-Recillas A, Alonso-Castro AJ, Esquivel-Juárez D, Zapata-Morales JR, Yáñez-Pérez V, Álvarez-Camacho D, Medina-Rivera YE, González-Chávez MM, Gasca-Martínez D, Ortiz-Andrade R. Antidiarrheal, vasorelaxant, and neuropharmacological actions of the diterpene tilifodiolide. *Drug Dev Res*, 2019;80(7):981-991. <https://doi.org/10.1002/ddr.21578> .
3. Anggono V, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2012 Jun;22(3):461-9. [https://doi: 10.1016/j.conb.2011.12.006](https://doi:10.1016/j.conb.2011.12.006).
4. Aricioglu F, Yillar O, Korcegez E, Berkman K. Effect of harmaline on the convulsive threshold in epilepsy models in mice. *Ann N Y Acad Sci*, 2003;1009:190-195. <https://doi.org/10.1196/annals.1304.023>
5. Aricioglu F, Yillar O, Korcegez E, Berkman K. Effect of harmaline on the convulsive threshold in epilepsy models in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1009:190-5. [https://doi: 10.1196/annals.1304.023](https://doi:10.1196/annals.1304.023).
6. Aulton et. al. (2004). *Farmacología, la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. España: Elsevier.
7. Ávila-Villarreal G, González-Trujano ME, Carballo-Villalobos AI, Aguilar-Guadarrama B, García-Jiménez S, Giles-Rivas DE, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S. Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. *J Ethnopharmacol*. 2016 Nov 4;192:90-98. [https://doi: 10.1016/j.jep.2016.07.006](https://doi:10.1016/j.jep.2016.07.006).
8. Barbalho CA, Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain Res*. 2009 Apr 24;1267:65-76. [https://doi: 10.1016/j.brainres.2009.02.042](https://doi:10.1016/j.brainres.2009.02.042).
9. Bowery NG. Historical perspective and emergence of the GABA_B receptor. *Adv Pharmacol*. 2010;58:1-18. [https://doi: 10.1016/S1054-3589\(10\)58001-3](https://doi:10.1016/S1054-3589(10)58001-3).

10. Brodniewicz T, Gryniewicz G. Preclinical drug development. *Acta Pol Pharm*, 2010;67(6):578-585.
11. Busti D, Geracitano R, Whittle N, Dalezios Y, Mańko M, Kaufmann W, Sätzler K, Singewald N, Capogna M, Ferraguti F. Different fear states engage distinct networks within the intercalated cell clusters of the amygdala. *J Neurosci*. 2011 Mar 30;31(13):5131-44. [https://doi: 10.1523/JNEUROSCI.6100-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6100-10.2011).
12. Bustos-Obregon E, Vargas A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biol Res*, 2010;43(3):357-362.
13. Calabrese EJ. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate. *Crit Rev Toxicol*, 2008;38(6):489-542. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408440802014238>.
14. Castro-González M.I, Carrillo-Domínguez S, Pérez-Gil F. Composición química de *Macrocystis pyrifera* (sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en alimentación animal. *Ciencias Marinas* 1994;20(1):33-40.
15. Castro-Silva ES, Bello M, Hernández-Rodríguez M, Correa-Basurto J, Murillo-Álvarez JI, Rosales-Hernández MC, Muñoz-Ochoa M. In vitro and in silico evaluation of fucosterol from *Sargassum horridum* as potential human acetylcholinesterase inhibitor. *J Biomol Struct Dyn*. 2019;37(12):3259-3268. doi: <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1505551>.
16. Cha SH, Ko SC, Kim D, Jeon YJ. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish. *J Dermatol*. 2011;38(4):354-363. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.00983.x>.
17. Chan YY, Kim KH, Cheah SH. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1183-1188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.050>.
18. Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nat Med*. 1999 Aug;5(8):888-94. [https://doi: 10.1038/11330](https://doi.org/10.1038/11330).
19. Chen YY, Chen JC, Kuo YH, Lin YC, Chang YH, Gong HY, Huang CL. Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus*

- vannamei. Dev Comp Immunol. 2016;55:144-151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>.
20. Clark G, Koester AG, Pearson DW. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. Psychopharmacologia. 1971;20(2):169-171. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00404370>.
21. Contractor A, Swanson GT, Sailer A, O'Gorman S, Heinemann SF. Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. J Neurosci. 2000 Nov 15;20(22):8269-78. [https://doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08269.2000](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08269.2000).
22. Coulter DA, Yue C, Ang CW, Weissinger F, Goldberg E, Hsu FC, Carlson GC, Takano H. Hippocampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. J Physiol. 2011 Apr 15;589(Pt 8):1893-903. [https://doi: 10.1113/jphysiol.2010.202184](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202184).
23. Crocq MA. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. Dialogues Clin Neurosci. 2015 Sep;17(3):319-25.
24. Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. J Ethnopharmacol. 2007;110(2):334-342. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.001>.
25. Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. J Ethnopharmacol. 2007 Mar 21;110(2):334-42. [https://doi: 10.1016/j.jep.2006.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.001).
26. Deng L, Shi AM, Wang Q. Sedative-hypnotic and anxiolytic effects and the mechanism of action of aqueous extracts of peanut stems and leaves in mice. J Sci Food Agric. 2018;98(13):4885-4894. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9020>.
27. Deng L, Shi AM, Wang Q. Sedative-hypnotic and anxiolytic effects and the mechanism of action of aqueous extracts of peanut stems and leaves in mice. J Sci Food Agric. 2018 Oct;98(13):4885-4894. [https://doi: 10.1002/jsfa.9020](https://doi.org/10.1002/jsfa.9020).
28. Dias PF, Siqueira JM Jr, Vendruscolo LF, de Jesus Neiva T, Gagliardi AR, Maraschin M, Ribeiro-do-Valle RM. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. Cancer Chemother Pharmacol. 2005;56(4):436-446. doi: <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0995-7>.

29. Dorandeu F, Barbier L, Dhote F, Testylier G, Carpentier P. Ketamine combinations for the field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Review of current data and perspectives. *Chem Biol Interact.* 2013a Mar 25;203(1):154-9. [https://doi: 10.1016/j.cbi.2012.09.013](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.013).
30. Dorandeu F, Dhote F, Barbier L, Baccus B, Testylier G. Treatment of status epilepticus with ketamine, are we there yet? *CNS Neurosci Ther.* 2013b Jun;19(6):411-27. [https://doi: 10.1111/cns.12096](https://doi.org/10.1111/cns.12096).
31. D'Orazio N, Gemello E, Gammone MA, de Girolamo M, Ficoneri C, Riccioni G. Fucoxantin: a treasure from the sea. *Mar Drugs.* 2012;10(3):604-616. doi: <https://doi.org/10.3390/md10030604>.
32. Durant C, Christmas D, Nutt D. The pharmacology of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci.* 2010;2:303-30. [https://doi: 10.1007/7854_2009_8](https://doi.org/10.1007/7854_2009_8).
33. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018;139:73-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015>.
34. Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol.* 2006;539(3):168-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.004>.
35. Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jun 13;539(3):168-76. [https://doi: 10.1016/j.ejphar.2006.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.004).
36. Ganellen RJ, Matuzas W, Uhlenhuth EH, Glass R, Easton CR. Panic disorder, agoraphobia, and anxiety-relevant cognitive style. *J Affect Disord.* 1986 Nov-Dec;11(3):219-25. [https://doi: 10.1016/0165-0327\(86\)90073-x](https://doi.org/10.1016/0165-0327(86)90073-x).
37. González-Trujano ME, Hernández-Sánchez LY, Muñoz Ocotero V, Dorazco-González A, Guevara Fefer P, Aguirre-Hernández E. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. *Pharm Biol.* 2017;55(1):1569-1576. doi: <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310908>.
38. González-Trujano ME, Hernández-Sánchez LY, Muñoz Ocotero V, Dorazco-González A, Guevara Fefer P, Aguirre-Hernández E. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. *Pharm Biol.* 2017 Dec;55(1):1569-1576. [https://doi: 10.1080/13880209.2017.1310908](https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310908)

39. González-Trujano ME, Hernández-Sánchez LY, Muñoz Ocotero V, Dorazco-González A, Guevara Fefer P, Aguirre-Hernández E. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. *Pharm Biol.* 2017 Dec;55(1):1569-1576. [https://doi: 10.1080/13880209.2017.1310908](https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310908).
40. Goold CP, Nicoll RA. Single-cell optogenetic excitation drives homeostatic synaptic depression. *Neuron.* 2010 Nov 4;68(3):512-28. [https://doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.020](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.020)
41. Gordon JA, Hen R. The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med.* 2004;5(1):27-40. [https://doi: 10.1385/NMM:5:1:027](https://doi.org/10.1385/NMM:5:1:027)
42. Hernández-Carmona G, Rodríguez-Montesinos YE, Arvizu-Higuera DL, Reyes-Tisnado R, Murillo-Álvarez JI, Muñoz-Ochoa M. Technological Advance for Alginate Production in Mexico. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 2012;13(2):155-168. Velasco-González O, Echavarría-Almeida S, Sifuentes-Díaz de León A, Casas-Valdez M. Using seaweed *Sargassum* spp. added to wheat flour to make cookies for human consumption. *Bioagro*, 2013;25(3):189-194.
43. Hill MN, Gorzalka BB. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009 Dec;8(6):451-8. [https://doi: 10.2174/187152709789824624](https://doi.org/10.2174/187152709789824624).
44. Huang CY, Kuo CH, Chen PW. Compressional-Puffing Pretreatment Enhances Neuroprotective Effects of Fucoidans from the Brown Seaweed *Sargassum hemiphyllum* on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Molecules.* 2017;23(1):78. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23010078>.
45. Kamei Y, Sueyoshi M, Hayashi K, Terada R, Nozaki H. The novel anti-Propionibacterium acnes compound, Sargafuran, found in the marine brown alga *Sargassum macrocarpum*. *J Antibiot (Tokyo).* 2009;62(5):259-263. doi: <https://doi.org/10.1038/ja.2009.25>.
46. Kang MC, Lee H, Choi HD, Jeon YJ. Antioxidant properties of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Sargassum thunbergii*. *Int J Biol Macromol.* 2019;132:142-149. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.178>.
47. Katzung B, et al. (2013). *Farmacología básica y clínica*, 12 ed.. México: McGraw-Hill Interamericana.

48. Klausberger T, Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*. 2008 Jul 4;321(5885):53-7. [https://doi: 10.1126/science.1149381](https://doi.org/10.1126/science.1149381).
49. Korpi ER, Mattila MJ, Wisden W, Lüddens H. GABA(A)-receptor subtypes: clinical efficacy and selectivity of benzodiazepine site ligands. *Ann Med*. 1997 Aug;29(4):275-82. [https://doi: 10.3109/07853899708999348](https://doi.org/10.3109/07853899708999348).
50. Kumar V. Characterization of anxiolytic and neuropharmacological activities of Silexan. *Wien Med Wochenschr*. 2013;163(3-4):89-94. doi: <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0164-2>.
51. Kumar V. Characterization of anxiolytic and neuropharmacological activities of Silexan. *Wien Med Wochenschr*. 2013 Feb;163(3-4):89-94. [https://doi: 10.1007/s10354-012-0164-2](https://doi.org/10.1007/s10354-012-0164-2).
52. Lallement G, Carpentier P, Collet A, Pernot-Marino I, Baubichon D, Blanchet G. Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Res*. 1991 Nov 1;563(1-2):234-40. [https://doi: 10.1016/0006-8993\(91\)91539-d](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91539-d).
53. Leite JP, Neder L, Arisi GM, Carlotti CG Jr, Assirati JA, Moreira JE. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data?. *Epilepsia*. 2005;46 Suppl 5:134-41. [https://doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.01021.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.01021.x).
54. Lerma J, Marques JM. Kainate receptors in health and disease. *Neuron*. 2013 Oct 16;80(2):292-311. [https://doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.045](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.045).
55. Ley General de Salud, artículo 221. 2005. Citado el 12 sep 2019. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf
56. Lim S, Choi AH, Kwon M, Joung EJ, Shin T, Lee SG, Kim NG, Kim HR. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. *Food Chem*. 2019;278:178-184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.058>.
57. Lin X, Li X, Lin X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. *Molecules*, 2020;25(6):1375. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25061375>.
58. Liu L, Heinrich M, Myers S, Dworjanyn SA. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a

- phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(3):591-619. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.046>.
59. Locke AB, Kirst N, Shultz CG. Diagnosis and management of generalized anxiety disorder and panic disorder in adults. *Am Fam Physician.* 2015;91(9):617-624.
60. Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science.* 2000 Oct 6;290(5489):131-4. [https://doi: 10.1126/science.290.5489.131](https://doi.org/10.1126/science.290.5489.131).
61. Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE. A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron.* 2005 Dec 22;48(6):1025-37. [https://doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.029](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.029).
62. Mattio, L., Payri, C.E. 190 Years of *Sargassum* Taxonomy, Facing the Advent of DNA Phylogenies. *Bot. Rev.* 2011; 77: 31–70. doi: <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9060>
63. McDonough JH Jr, Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Sep;21(5):559-79. [https://doi: 10.1016/s0149-7634\(96\)00050-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00050-4).
64. Micallef J, Soubrouillard C, Guet F, Le Guern ME, Alquier C, Bruguerolle B, Blin O. A double blind parallel group placebo controlled comparison of sedative and mnesic effects of etifoxine and lorazepam in healthy subjects [corrected]. *Fundam Clin Pharmacol.* 2001 Jun;15(3):209-16. [https://doi: 10.1046/j.1472-8206.2001.00025.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2001.00025.x).
65. Mody I, Pearce RA. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci.* 2004 Sep;27(9):569-75. [https://doi: 10.1016/j.tins.2004.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.002).
66. Möhler H. Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology. *Dialogues Clin Neurosci.* 2002 Sep;4(3):261-9.
67. Mula M, Pini S, Cassano GB. The role of anticonvulsant drugs in anxiety disorders: a critical review of the evidence. *J Clin Psychopharmacol.* 2007;27(3):263-272. doi: <https://doi.org/10.1097/jcp.0b013e318059361a>.
68. Mula M. Using anxiolytics in epilepsy: neurobiological, neuropharmacological and clinical aspects. *Epileptic Disord.* 2016;18(3):217-227. doi: <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0837>.
69. Muñoz-Ochoa M, Murillo-Alvarez JI, Zermeño-Cervantes LA, Martínez-Díaz S, Rodríguez-Riosmena R. Screening of extracts of algae from Baja California sur, Mexico

- as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2010;14(9):739-747.
70. Naylor DE, Liu H, Niquet J, Wasterlain CG. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2013 Jun;54:225-38. [https://doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.015](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.015)
71. Neumann ID, Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends Neurosci*. 2012 Nov;35(11):649-59. [https://doi: 10.1016/j.tins.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.004).
72. Nguyen N, Fakra E, Pradel V, Jouve E, Alquier C, Le Guern ME, Micallef J, Blin O. Efficacy of etifoxine compared to lorazepam monotherapy in the treatment of patients with adjustment disorders with anxiety: a double-blind controlled study in general practice. *Hum Psychopharmacol*. 2006 Apr;21(3):139-49. [https://doi: 10.1002/hup.757](https://doi.org/10.1002/hup.757).
73. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
74. Nothdurfter C, Baghai TC, Schüle C, Rupprecht R. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for anxiety and neurologic disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2012 Nov;262 Suppl 2:S107-12. [https://doi: 10.1007/s00406-012-0352-5](https://doi.org/10.1007/s00406-012-0352-5).
75. Nyambe MN, Koekemoer TC, van de Venter M, Goosen ED, Beukes DR. In Vitro Evaluation of the Phytopharmacological Potential of *Sargassum incisifolium* for the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Medicines (Basel)*, 2019;6(2):49. doi: <https://doi.org/10.3390/medicines6020049>.
76. O.O. Oyesiku, A. Egunyomi. Identification and chemical studies of pelagic masses of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon and *S. fluitans* (Borgesen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2014; 13(10): 1188-1193. doi: <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12335>
77. Osterweil EK, Chuang SC, Chubykin AA, Sidorov M, Bianchi R, Wong RK, Bear MF. Lovastatin corrects excess protein synthesis and prevents epileptogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuron*. 2013 Jan 23;77(2):243-50. [https://doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.034](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.034)
78. Pack AM. Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 2019;25(2):306-321. doi: <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000707>.

79. Palanisamy S, Vinosha M, Rajasekar P, Anjali R, Sathiyaraj G, Marudhupandi T, Selvam S, Prabhu NM, You S. Antibacterial efficacy of a fucoidan fraction (Fu-F2) extracted from *Sargassum polycystum*. *Int J Biol Macromol*, 2019;125:485-495. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.070>.
80. Park C, Jeong JW, Lee DS, Yim MJ, Lee JM, Han MH, Kim S, Kim HS, Kim GY, Park EK, Jeon YJ, Cha HJ, Choi YH. *Sargassum serratifolium* Extract Attenuates Interleukin-1 β -Induced Oxidative Stress and Inflammatory Response in Chondrocytes by Suppressing the Activation of NF- κ B, p38 MAPK, and PI3K/Akt. *Int J Mol Sci*, 2018;19(8):2308. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19082308>.
81. Pérez Ortega, Toche, Vidal Valero. 'Es un desastre ecológico: la crisis del sargazo en México'. [Internet]. 2020 [citado 19 septiembre 2019]; Disponible en: https://www.nytimes.com/es/2019/08/16/espanol/america-latina/sargazo-playas-mexico.html?te=1&nl=el-times&emc=edit_bn_20190918?campaign_id=42&instance_id=12457&segment_id=17109&user_id=3a41280478b74f2ff71c8134ccc93ce6®i_id=97168100
82. Pérez-Ortega G, Angeles-López GE, Argueta-Villamar A, González-Trujano ME. Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. *Biomed Pharmacother*, 2017;93:383-390. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.064>.
83. Pérez-Ortega G, Angeles-López GE, Argueta-Villamar A, González-Trujano ME. Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. *Biomed Pharmacother*. 2017 Sep;93:383-390. [https://doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.064](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.064)
84. Pinto A, Sesack SR. Ultrastructural analysis of prefrontal cortical inputs to the rat amygdala: spatial relationships to presumed dopamine axons and D1 and D2 receptors. *Brain Struct Funct*. 2008 Sep;213(1-2):159-75. [https://doi: 10.1007/s00429-008-0180-6](https://doi.org/10.1007/s00429-008-0180-6).
85. Poisbeau P, Gazzo G, Calvel L. Anxiolytics targeting GABA(A) receptors: Insights on etifoxine. *World J Biol Psychiatry*. 2018;19(sup1):S36-S45. [https://doi: 10.1080/15622975.2018.1468030](https://doi.org/10.1080/15622975.2018.1468030)
86. Pugazhendhi A, Prabhu R, Muruganatham K, Shanmuganathan R, Natarajan S. Anticancer, antimicrobial and photocatalytic activities of green synthesized magnesium oxide nanoparticles (MgONPs) using aqueous extract of *Sargassum wightii*. *J*

- Photochem Photobiol B, 2019;190:86-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.014>.
87. Quintal-Novelo C, Rangel-Méndez J, Ortiz-Tello Á, Graniel-Sabido M, Pérez-Cabeza de Vaca R, Moo-Puc R. A *Sargassum fluitans* Borgesen Ethanol Extract Exhibits a Hepatoprotective Effect In Vivo in Acute and Chronic Liver Damage Models. *Biomed Res Int*, 2018;2018:6921845. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/6921845>.
88. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Najj T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru*, 2015;23(1):20. doi: <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>.
89. Ramos-Morales, FR, Correa-Basurto, J, Saavedra-Vélez, M, Acosta-Hernández, ME, Gasca-Pérez, E, Pérez-Palacios, A & Trujillo-Ferrara. Model PTZ primary screening for the development of new molecules with anticonvulsant activity. *Arc Neurocién*, 2012; 17(1):45-48.
90. Rang y Dale. (2012). *Farmacología*. Barcelona, España: Elsevier.
91. Ruehle S, Rey AA, Remmers F, Lutz B. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol*. 2012 Jan;26(1):23-39. [https://doi: 10.1177/0269881111408958](https://doi.org/10.1177/0269881111408958).
92. Russo I, Bonini D, Via LL, Barlati S, Barbon A. AMPA receptor properties are modulated in the early stages following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuromolecular Med*. 2013 Jun;15(2):324-38. [https://doi: 10.1007/s12017-013-8221-6](https://doi.org/10.1007/s12017-013-8221-6).
93. Ryley Parrish R, Albertson AJ, Buckingham SC, Hablitz JJ, Mascia KL, Davis Haselden W, Lubin FD. Status epilepticus triggers early and late alterations in brain-derived neurotrophic factor and NMDA glutamate receptor Grin2b DNA methylation levels in the hippocampus. *Neuroscience*. 2013 Sep 17;248:602-19. [https://doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.029](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.029)
94. Sanders SK, Shekhar A. Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995 Dec;52(4):701-6. [https://doi: 10.1016/0091-3057\(95\)00153-n](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00153-n).
95. Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 2006 Jan 19;439(7074):283-9. [https://doi: 10.1038/nature04367](https://doi.org/10.1038/nature04367).

96. Seeburg DP, Feliu-Mojer M, Gaiottino J, Pak DT, Sheng M. Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity. *Neuron*. 2008 May 22;58(4):571-83. [https://doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.021](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.021).
97. Servant D, Graziani PL, Moysé D, Parquet PJ. [Treatment of adjustment disorder with anxiety: efficacy and tolerance of etifoxine in a double-blind controlled study]. *Encephale*. 1998 Nov-Dec;24(6):569-74.
98. Shader RI. Reflections on the Phases of the Moon and the Phases of Drug Development. *J Clin Psychopharmacol*, 2017;37(3):285-286. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000700>.
99. Shi YZ, Chen JC, Chen YY, Kuo YH, Li HF. Endogenous molecules released by haemocytes receiving *Sargassum oligocystum* extract lead to downstream activation and synergize innate immunity in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2018;76:1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.033>.
100. Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem*. 2002 Aug;2(8):795-816. [https://doi: 10.2174/1568026023393507](https://doi.org/10.2174/1568026023393507).
101. Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem*. 2002 Aug;2(8):795-816. [https://doi: 10.2174/1568026023393507](https://doi.org/10.2174/1568026023393507).
102. Sieghart W. Structure, pharmacology, and function of GABA_A receptor subtypes. *Adv Pharmacol*. 2006;54:231-63. [https://doi: 10.1016/s1054-3589\(06\)54010-4](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(06)54010-4).
103. Sierra-Vélez L, Álvarez-León R. Comparación bromatológica de las algas nativas (*Gracilariopsis tenuifrons*, *Sargassum Filipendula*) y exóticas (*Kappaphycus Alvarezii*) del Caribe Colombiano. *Boletín científico centro de museos Museo de Historia Natural* 2009;13(2):17-25.
104. Sigel E, Lüscher BP. A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABA_A receptors. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(2):241-6. [https://doi: 10.2174/156802611794863562](https://doi.org/10.2174/156802611794863562).
105. Stappen VG (1996) Introduction, biology and ecology of *Artemia*. Manual on the production and use of live food for aquaculture. In *FAO Fisheries Technical Paper* 361:79–106

106. Starcevic V, Sammut P, Berle D, Hannan A, Milicevic D, Moses K, Lamplugh C, Eslick GD. Can levels of a general anxiety-prone cognitive style distinguish between various anxiety disorders?. *Compr Psychiatry*. 2012 Jul;53(5):427-33. [https://doi: 10.1016/j.comppsy.2011.08.004](https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2011.08.004).
107. Straube T, Glauer M, Dilger S, Mentzel HJ, Miltner WH. Effects of cognitive-behavioral therapy on brain activation in specific phobia. *Neuroimage*. 2006 Jan 1;29(1):125-35. [https://doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.07.007](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.07.007)
108. Tavares-Sakata. Cafeína para el Tratamiento del Dolor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012; 62: 3: 387-401
109. Thorsell A. Brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in mediating stress and anxiety. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Oct;235(10):1163-7. [https://doi: 10.1258/ebm.2010.009331](https://doi.org/10.1258/ebm.2010.009331)
110. Turrigiano G. Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol*. 2007 Jun;17(3):318-24. [https://doi: 10.1016/j.conb.2007.04.004](https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.004)
111. Turrigiano G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan 1;4(1):a005736. [https://doi: 10.1101/cshperspect.a005736](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005736).
112. Uhlenhuth EH, Starcevic V, Warner TD, Matuzas W, McCarty T, Roberts B, Jenkusky S. A general anxiety-prone cognitive style in anxiety disorders. *J Affect Disord*. 2002 Aug;70(3):241-9. [https://doi: 10.1016/s0165-0327\(01\)00457-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0327(01)00457-8).
113. Usami N, Okuda T, Yoshida H, Kimura T, Watanabe K, Yoshimura H, Yamamoto I. Synthesis and pharmacological evaluation in mice of halogenated cannabidiol derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1999;47(11):1641-1645. doi: <https://doi.org/10.1248/cpb.47.1641>.
114. Usami N, Okuda T, Yoshida H, Kimura T, Watanabe K, Yoshimura H, Yamamoto I. Synthesis and pharmacological evaluation in mice of halogenated cannabidiol derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1999 Nov;47(11):1641-5. [https://doi: 10.1248/cpb.47.1641](https://doi.org/10.1248/cpb.47.1641).
115. Van Tussenbroek BI, Hernández Arana HA, Rodríguez-Martínez RE, Espinoza-Avalos J, Canizales-Flores HM, González-Godoy CE, Barba-Santos MG, Vega-Zepeda A, Collado-Vides L. Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Mar Pollut Bull*, 2017;122(1-2):272-281. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.057>.

116. Van't Veer A, Carlezon WA Jr. Role of kappa-opioid receptors in stress and anxiety-related behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Oct;229(3):435-52. [https://doi: 10.1007/s00213-013-3195-5](https://doi.org/10.1007/s00213-013-3195-5).
117. Vaseghi G, Sharifi M, Dana N, Ghasemi A, Yegdaneh A. Cytotoxicity of *Sargassum angustifolium* Partitions against Breast and Cervical Cancer Cell Lines. *Adv Biomed Res*, 2018;7:43. doi: https://doi.org/10.4103/abr.abr_259_16
118. Vega-Villasante F, Cupul-Magaña A, Nolasco-Soria H, Carrillo-Farnés O. Las algas marinas *Sargassum* spp. y *Macrocystis pyrifera*: ¿una alternativa para el forraje del ganado bovino en la península de Baja California. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 2006;40(4):439-448.
119. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 1976;83(3):482-504.
120. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976 May;83(3):482-504.
121. Walum E. Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect*,1998;106 Suppl 2(Suppl 2):497-503. doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.98106497>.
122. Walum E. Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect*. 1998 Apr;106 Suppl 2(Suppl 2):497-503. [https://doi: 10.1289/ehp.98106497](https://doi.org/10.1289/ehp.98106497).
123. Wang M, Chen L, Liu Z, Zhang Z, Qin S, Yan P. Isolation of a novel alginate lyase-producing *Bacillus litoralis* strain and its potential to ferment *Sargassum horneri* for biofertilizer. *Microbiologyopen*, 2016 Dec;5(6):1038-1049. doi: <https://doi.org/10.1002/mbo3.387>.
124. Wasterlain CG, Naylor DE, Liu H, Niquet J, Baldwin R. Trafficking of NMDA receptors during status epilepticus: therapeutic implications. *Epilepsia*. 2013 Sep;54 Suppl 6(06):78-80. [https://doi: 10.1111/epi.12285](https://doi.org/10.1111/epi.12285).
125. Williams A, Feagin R. *Sargassum* as a natural solution to enhance dune plant growth. *Environ Manage*, 2010;46(5):738-747. doi: <https://doi.org/10.1007/s00267-010-9558-3>.
126. Xiao H, Chen C, Li C, Huang Q, Fu X. Physicochemical characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of selenized polysaccharides from *Sargassum pallidum*. *Int J Biol Macromol*, 2019;132:308-315. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.138>.
127. Xue H, Li J, Xie H, Wang Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int J Biol Sci*, 2018;14(10):1232-1244. doi: <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>.

128. Yang WN, Chen PW, Huang CY. Compositional Characteristics and In Vitro Evaluations of Antioxidant and Neuroprotective Properties of Crude Extracts of Fucoidan Prepared from Compressional Puffing-Pretreated *Sargassum crassifolium*. *Mar Drugs*, 2017;15(6):183. doi: <https://doi.org/10.3390/md15060183>.
129. Yende SR, Harle UN, Chaugule BB. Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum* species. *Pharmacogn Rev*, 2014;8(15):1-7. doi: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125514>.
130. Yokoi K, Konomi A. Toxicity of so-called edible hijiki seaweed (*Sargassum fusiforme*) containing inorganic arsenic. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2012;63(2):291-297. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.04.006>.
131. Zhang FY, Li JJ, Zhou Y, Xu XY. [Review for sedative and hypnotic mechanism of sedative traditional Chinese medicine and relative active components on neurotransmitters]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2016;41(23):4320-4327. doi: <https://doi.org/10.4268/cjcmm20162305>.
132. Zih-yi L, Chin-Hsiu Y, Yu-Ting L, Hsiang-Ling S, Kai-Wen K, Fu-Chen L, Ciao-Ting C, Yi-Tsen L, Hsin-Fen H, Yung-Hsiang L. The Potential Application of Spring *Sargassum glaucescens* Extracts in the Moisture-Retention of Keratinocytes and Dermal Fibroblast Regeneration after UVA-Irradiation. *Cosmetics*, 2019;6(1):1-17; doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics6010017>