

UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Interacción de Galphimina-A con los sistemas GABAérgicos
y Glutamatérgicos, en modelos de ansiedad y electrofisiología
de la amígdala basolateral**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

PRESENTA:

M. en C. DANTE AVILÉS MONTES

Directores de tesis:

Dr. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Dra. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

Asesor:

Dr. JAIME TORTORIELLO GARCÍA

México, D. F.

Noviembre, 2015

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Titular “C”, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

Investigador Titular “B”, Centro de Investigación Biomédica del Sur.
Instituto Mexicano del Seguro Social.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

ASESOR

DR. JAIME TORTORIELLO GARCÍA

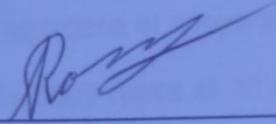
Investigador Titular “D”, Centro de Investigación Biomédica del Sur.
Instituto Mexicano del Seguro Social.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, de la Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Interacción de Galphimina-A con los sistemas GABAérgicos y Glutamatérgicos, en modelos de ansiedad y electrofisiología de la amígdala basolateral", que presentó el alumno M. en C. Dante Avilés Montes el día 03 de Noviembre de 2015.

Presidente.

Dr. Rubén Román Ramos
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretaria.

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz
Instituto Mexicano del Seguro Social





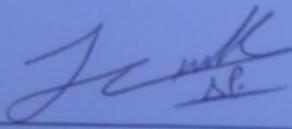
Vocal.

Dr. Jaime Tortoriello García
Instituto Mexicano del Seguro Social



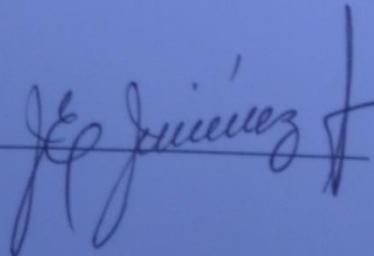
Vocal.

Dr. Julio César Almanza Pérez
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal.

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Instituto Mexicano del Seguro Social



Agradecimientos

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Dante Avilés Montes, agradece el apoyo proporcionado por el CONACyT con una Beca del 01 de octubre de 2009 hasta el 30 de septiembre de 2012, con Número de registro **206839**.

La presente investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (CB-2012-01-181180). Y por la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/G11/928).

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Fitofarmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.



Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana.



[Escriba texto]

Índice general

Índice de Figuras	III
Índice de tablas	V
Lista de abreviaturas	VI
Resumen	VII
Abstract	IX
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Ansiedad	2
2.1.1 Mecanismos fisiopatológicos de los trastornos de ansiedad	3
2.2 La amígdala	4
2.3 Ácido γ-amino-butírico (GABA) en la ansiedad	5
2.4 Glutamato en la ansiedad	7
2.5 Tratamiento de los trastornos de Ansiedad	12
2.6 <i>Galphimia glauca</i> Cav, Sinónimo: <i>Thryallis glauca</i> (Cav.) Kuntze	14
2.7 Usos y farmacología	15
3. Planteamiento del problema	17
4. Pregunta de investigación	18
5. Hipótesis	18
6. Objetivo general	19
6.1 Objetivos específicos	19
7. Material y métodos	20
7.1 Material vegetal	20
7.2 Obtención de un pool de galphiminas	20
7.2.1 Aislamiento e identificación de G-A	21
7.3 Animales	23
7.4 Sustancias empleadas	23
7.5 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC), campo abierto (CA)	24
7.6 Registros de actividad extracelular en rata íntegra	26
7.7 Registro de la frecuencia de disparo en la región del ABL	28

7.8	Registros conductuales	30
7.9	Análisis farmacológico	31
7.10	Análisis histológico	32
7.11	Análisis estadístico	32
8.	Resultados	33
8.1	Material vegetal	33
8.2	Obtención de un pool de galphiminas	34
8.2.1	Aislamiento e identificación de G-A	34
8.3	Laberinto elevado en forma de cruz	40
8.4	Campo abierto (CA)	44
8.5	Registros electrofisiológicos. Registro extracelular en la ABL.	45
9.	Discusión	57
10.	Conclusiones	65
11.	Perspectivas	66
12.	Referencias bibliográficas	67
13.	Anexos	76

Índice de Figuras

Figura 1. Arbusto de <i>Galphimia glauca</i> en floración.....	15
Figura 2. Estrategia experimental para obtener el pool de galphiminas.....	21
Figura 3. Implantación de los electrodos mediante cirugía estereotáxica.	27
Figura 4. Vistas dorsal y lateral de un cráneo de una rata Wistar macho. Las posiciones del punto bregma y lambda se muestran en la vista lateral.....	28
Figura 5. Dispositivo del Laberinto Elevado en forma de Cruz.....	30
Figura 6. Dispositivo del Campo Abierto.	31
Figura 7. Lámina de coordenadas estereotáxicas resaltando la región de la ABL.	33
Figura 8. Cantidad y rendimientos obtenidos en la estrategia de extracción del material vegetal.....	35
Figura 9. Análisis cromatográfico por HPLC de una muestra de G-A.	39
Figura 10. Espectro de ¹ H RMN de una muestra de G-A.	40
Figura 11. Efecto producido por la administración oral de diferentes dosis de Galphimina-A (G-A) sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (% EBA) y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos (%TBA) de ratones en el modelo de LEC..	41
Figura 12. Efecto producido por la administración de bicuculina (BICC), picrotóxina (PTX), y pentilentetrazol (PTZ) sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (% EBA) y tiempo transcurrido en los brazo brazos abiertos (% TBA) de ratones ICR sobre el modelo de laberinto elevado en forma de cruz (LEC).....	42
Figura 13. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Bicuculina (BICC), G-A con Picrotóxina (PTX), y G-A con Pentilentetrazol (PTZ) sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (% EBA) y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos (% TBA) en el modelo de laberinto elevado en forma de cruz (LEC)..	43

Figura 14. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Diacepam (DZP) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL..	47
Figura 15. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Flumazenilo (FMZ) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL.....	49
Figura 16. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con picrotoxina (PTX) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL..	50
Figura 17. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con pentilinetetrazol (PTZ) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL..	51
Figura 18. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con bicuculina (BICC) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL..	52
Figura 19. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con faclofén (FCF) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL..	53
Figura 20. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con 2-metil-6-(feniletinil) piridina (MPEP) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL	54
Figura 21. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL	55
Figura 22. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Dizolcipina (MK-801) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de los trastornos de ansiedad.....	13
Tabla 2. Diseño experimental para los modelos de actividad ansiolítica y motora (LEC y CA).	25
Tabla 3. Diseño experimental para los modelos de actividad electrofisiológica en ABL.	29
Tabla 4. Fraccionamiento del pool de galphiminas.	36
Tabla 5. Fraccionamiento de la fracción B obtenida del pool de galphiminas.	36
Tabla 6. Fraccionamiento de fracción IV.	37
Tabla 7. Efecto producido por la administración de diferentes dosis de Galphimina-A (G-A) y diferentes fármacos GABAérgicos sobre el número total de cruces (CT) y el número de estiramientos verticales (R) de ratones ICR expuestos al paradigma de campo abierto.....	44
Tabla 8. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) y diferentes fármacos GABAérgicos sobre el número total de cruces (CT) y estiramientos verticales (R) en ratones ICR expuestos al paradigma de campo abierto.	45

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ABL	Amígdala basolateral
ACe	Núcleo central de la amígdala
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de Varianza
BDZ	Benzodiazepinas
BICC	Bicuculina
CA	Campo abierto
Ca ²⁺	Ión calcio
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₃ COCH ₃	Acetona
CHCl ₃	Cloroformo
CT	Número total de cruces
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DZP	Diazepam
EBA	Entradas a los brazos abiertos
E _{máx}	Efecto máximo
FCF	Faclofén
G-A	Galphimina-A
G-B	Galphimina-B
G-E	Galphimina-E
GABA	Ácido γ -amino-butírico
GABA _A R	Receptor del Ácido γ -amino-butírico del tipo A
GABA _B R	Receptor del Ácido γ -amino-butírico del tipo B
GABA _{B(1)} R	Receptor del Ácido γ -amino-butírico del tipo B subtipo 1
GABA _C R	Receptor del Ácido γ -amino-butírico del tipo C
K ⁺	Ión potasio
KCO ₃	Carbonato de potasio
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia

ICR	Cepa de ratones de <i>Institute of CancerResearch</i>
i.p.	Intra peritoneal
i.v.	Intra venosa
LEC	Laberinto elevado en forma de cruz
MeOH	Metanol
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MK-801	Dizocilpina
MPEP	2-metil-6-(feniletinil)piridina
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros (10^{-9} m)
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
PTX	Picrotóxina
PTZ	Pentilentetrazol
R	Estiramientos verticales
rAMPA	Receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de protón
rNMDA	Receptores de ácido N-metil-D-aspartato
rKainato	Receptores de kainato
SNC	Sistema nervioso central
TBA	Tiempo de permanencia en brazos abiertos del laberinto elevado en forma de cruz.
TC	Tiempo de permanencia en brazos cerrados del laberinto elevado en forma de cruz.
vo	Vía oral
wt	Cepa silvestre

Resumen

Galphimia glauca es una especie vegetal que ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de los trastornos nerviosos. Un extracto estandarizado de *G. glauca* mostró efectividad terapéutica en un estudio clínico doble

ciego, controlado y aleatorizado en pacientes con trastorno de ansiedad generalizada. Los compuestos que presentan la actividad ansiolítica son los nor-secotriterpenos denominados Galphiminas; Galphimina-A y Galphimina-B son prominentes por su efecto ansiolítico demostrado. En el presente trabajo la administración oral de diferentes dosis (1.0, 1.5, 3.25, 7.5, 15, 30, 45 mg/kg) de G-A en ratones macho ICR sometidos a la prueba del laberinto elevado en forma de cruz (LEC) fue capaz de inducir un efecto ansiolítico significativo; ninguna de las dosis modificó la actividad motora espontánea de los ratones en la prueba de campo abierto (CA). La administración de G-A (30 mg/kg, vo) en ratones inhibió el efecto ansiogénico de picrotoxina (PTX, 2 mg/kg, i.p.), pero no el de bicuculina (BICC, 5 mg/kg, i.p.) ni pentilentetrazol (PTZ, 10 mg/kg i.p.) en el LEC. La combinación de G-A con estos fármacos se evaluó a través del registro extracelular *in vivo* de la amígdala basolateral (ABL). Se indujo un incremento dosis-dependiente de la tasa de disparo por la administración (*i.v.*) de diferentes dosis de G-A, mientras que el diazepam (DZP) disminuyó la tasa de disparo. La co-administración de G-A con DZP o flumazenilo (FMZ) no modificó el efecto producido por estos fármacos sobre la tasa de disparo, lo cual sugiere que G-A no interactúa directamente con el sistema GABAérgico, mientras que fue capaz de modificar el efecto producido por PTX, BICC y FCF, evidenciando un mecanismo de acción diferente. Los resultados de los registros electrofisiológicos en donde se co-administra G-A con los fármacos glutamatérgicos evidencian que G-A no interactúa directamente con MPEP, NMDA, MK-801 en la ABL. Si bien es importante determinar el mecanismo de acción de Galphimina-A por medio del cual ejerce su efecto ansiolítico, aún no queda claro cuál

es éste; a través de los resultados de este trabajo sabemos que Galphimina-A no ejerce el efecto ansiolítico por modular directamente a los sistemas GABAérgico y Glutamatérgico de la amígdala basolateral.

Palabras clave: *Galphimia glauca*; ansiedad; Galphimina-A; laberinto elevado en forma de cruz; campo abierto; registros electrofisiológicos; amígdala basolateral; bicuculina; picrotoxina; pentileno tetrazol; faclofén; MPEP, NMDA, MK-801.

Abstract

Galphimia glauca is a plant species that has been used in Mexican Traditional Medicine for the treatment of Central nervous system disorders. A standardized extract of *G. glauca* by means of double-blind, controlled, and randomized clinical

studies, has demonstrated therapeutic effectiveness in patients with generalized anxiety disorder. The anxiolytic compounds are the nor-secotriterpenes Galphimines, Galphimine-A (G-A) and Galphimine-B are prominent for their anxiolytic effect. In the present work, the oral administration of different doses (1.0, 1.5, 3.25, 7.5, 15, 30, 45 mg/kg) of G-A in ICR male mice submitted to the Elevated Plus Maze (EPM) test was capable of inducing a significant anxiolytic effect, while any of the doses modified the spontaneous motor activity of the mice in the Open field test (OFT). The administration of G-A (30 mg/kg, *p.o.*) in mice inhibited the anxiogenic effect of picrotoxin (PTX, 2 mg/kg, *i.p.*), but not of bicuculline (BCC, 5 mg/kg, *i.p.*) and pentylentetrazole (PTZ, 10 mg/kg, *i.p.*) in the EPM. The combination of G-A with these drugs was evaluated by means of *in vivo* extracellular recordings in basolateral amygdala (BLA). A dose-dependent increase of the firing rate on BLA neurons was induced by the administration (*i.v.*) of different doses of G-A, while diazepam (DZP) decreased the firing rate. The co-administration of G-A with DZP or flumazenilo (FMZ) did not modify the effect produced by these drugs on the firing rate. However, the co-administration of G-A modified the effect produced by PTX. G-A was able to produce an anxiolytic effect when administered at different doses orally in mice, without inducing an associated sedative effect. Electrophysiological recordings showed that the effect produced by G-A is different of that of DZP and suggest that G-A do not interact directly with the GABAergic system, while it was able to modify the effect produced by PTX, BCC and Phaclofen evidencing a different action mechanism. The results of the electrophysiological recordings where G-A is co-administered with glutamatergic drugs, show that G-A does not interact directly with the MPEP, NMDA,

MK-801 in the BLA. While it is important to determine the mechanism of action of Galphimina-A by which exerts its anxiolytic effect, it is still not clear what is this; through the results of this work we know Galphimina-A does not exert the anxiolytic effect, by directly modulate the GABAergic and glutamatergic systems in the basolateral amygdala.

Key words:

Galphimiaglauca; anxiety; Galphimine-A; elevated plus maze test; open field test; electrophysiological recordings; basolateral amygdala; bicuculline; picrotoxin; pentylenetetrazole; phaclophen; MPEP; NMDA; MK-801.

1. Introducción

Actualmente los trastornos de ansiedad son las enfermedades psiquiátricas con mayor prevalencia en Europa y Norteamérica, incluyendo México, y como tales representan una grave y creciente preocupación para los sistemas de salud. El tratamiento más empleado ha sido el uso de las benzodiazepinas (BZD) por su rápida acción y potentes efectos, pero con graves efectos secundarios como tolerancia, dependencia y adicción. Otras alternativas son los antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la enzima monoaminoxidasa, Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina, cuyos efectos se presentan después de varias semanas de administración, resultando en poco apego a éstos por parte de los pacientes, además con efectos colaterales. En los últimos años se han buscado recursos a partir de las plantas medicinales. Una de ellas es calderona amarilla (*Galphimia glauca*) para el tratamiento de trastornos nerviosos. Los antecedentes farmacológicos han demostrado el efecto ansiolítico de compuestos aislados como galphimina-B (G-B), galphimina-E (G-E) y galphimina-A (G-A). Por resultados obtenidos mediante técnicas de electrofisiología se sabe que G-B inhibe selectivamente a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, sin que se haya dilucidado el mecanismo de acción. Galphimina-A es una molécula que se diferencia de G-B porque en lugar de tener un hidrógeno en el carbono 6 presenta un grupo hidroxilo. En este trabajo se evaluó farmacológica y electrofisiológicamente la interacción de G-A con el sistema GABAérgico en modelos conductuales y electrofisiológicos.

2. Antecedentes

2.1 Ansiedad

La ansiedad es una respuesta normal y adaptativa del individuo para mantener un equilibrio con su entorno. Es una respuesta a la anticipación de una situación imaginada o real, la cual tiene una combinación de síntomas somáticos y vegetativos. Los síntomas somáticos o físicos son múltiples e incluyen incremento en la frecuencia cardíaca, dolor de cabeza, mareo o aturdimiento, náuseas y/o vómito, diarrea, hormigueo, tez pálida, sudoración, entumecimiento, dificultad para respirar y la sensación de opresión en el pecho, el cuello, los hombros o las manos (Kalining, 2011). Estos síntomas son producidos por las reacciones hormonales, musculares y cardiovasculares involucradas en la reacción de lucha o huida.

Los “trastornos de ansiedad” son las manifestaciones patológicas de la ansiedad y son eventos crónico-discapacitantes. Es un término general que abarca varias formas diferentes de miedo y ansiedad anormales y patológicas, y se presentan a menudo comorbilidad con otros trastornos mentales, en especial la depresión. Estas condiciones suelen estar relacionados con experiencias estresantes de la vida, especialmente cuando son crónicas y traumáticas. El estrés parece actuar como un factor precipitante y de predisposición en estas condiciones psiquiátricas. Uno caso extremo en particular, es el trastorno por estrés postraumático (TEPT), un trastorno de ansiedad crónica desarrollado en las consecuencias de la exposición al estrés

traumático y que persiste mucho después de la eliminación de los factores de estrés que participan(Jiang X. , Chen A. , Smerin S. , Zhang L , & H., 2011).

Los trastornos de ansiedad han sido clasificados(Cannistraro & Rauch, 2003) y ampliamente caracterizados en el "Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales"(Cavallini & Bellodi, 2001; "Trastornos de ansiedad," 1995).

En México, los trastornos de ansiedad son los que se presentan con mayor frecuencia (14.3 %) siendo las mujeres las que presentan mayor prevalencia mostrando una relación 2:1 con los hombres. La frecuencia en México de estos trastornos es: fobia específica (7.1 %), fobia social (4.7 %), trastorno por estrés postraumático (2.6 %), agorafobia sin crisis de angustia (2.5 %), Crisis de angustia (2.1 %) (Medina-Mora et al., 2003).

2.1.1 Mecanismos fisiopatológicos de los trastornos de ansiedad

Los trastornos de ansiedad son un grupo heterogéneo de enfermedades, en donde la etiología y patogénesis no es del todo clara, pero la disfunción de algunas regiones cerebrales como la amígdala, corteza cingulada anterior, hipocampo y corteza prefrontal media pueden ser las responsables. Una de las estructuras más importantes la cual se vincula con la aparición de los trastornos de ansiedad es la amígdala (Charney, 2003).

2.2 La amígdala

Esta estructura cerebral forma parte del sistema límbico, el cual es el centro emocional del cerebro (Kim & Gorman, 2005). La amígdala consolida estados emocionales como el miedo y la ansiedad (Kaufmann, Humpel, Alheid, & Marksteiner, 2003) de tal forma que modula las emociones que atemorizan a los individuos (Kent, Mathew, & Gorman, 2002; Paré, Quirk, & Ledoux, 2004). El miedo es el principal síntoma del trastorno de ansiedad y su comprensión ha permitido entender a este grupo de enfermedades (Garakani, Mathew, & Charney, 2006). Esta zona forma un complejo de estructuras como: los núcleos lateral, basal, central basal accesorio, medial y cortical y llamados en conjunto la amígdala basolateral (ABL), ésta recibe información sensorial del tálamo, corteza e hipocampo ventral lo que activa y modula la transmisión sináptica en áreas blanco, apropiadas para la integración de la información sensorial. La amígdala manda proyecciones sinápticas a corteza frontal orbital, hipocampo, estriado ventral y dorsal y núcleo central de la amígdala (ACe), provocando diversas respuestas conductuales en los individuos (McDonald, 1998). La regulación de la ansiedad en la amígdala se modula por diferentes neurotransmisores y la modulación de éstos en la amígdala, ejerce efectos ansiolíticos (M. Davis, 1992). La amígdala es una estructura anatómicamente heterogénea que se compone de más de 10 núcleos y áreas corticales con sus subdivisiones, cada una de las cuales tiene características únicas en cuanto a composición molecular, citoarquitectura, naturaleza química e interconexiones (Pitkänen, Savander, Nurminen, & Ylinen, 2003). De manera consistente con su estructura anatómica, las funciones de los diferentes núcleos amigdalinos varían

desde determinan la significancia emocional de las señales sensoriales hasta modular la memoria los recuerdos emotivos y la atención. Un daño o funcionamiento anormal de la amígdala o alguno de sus subnúcleos puede dirigir en la aparición de diversos padecimientos humanos, tales como la epilepsia, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, depresión, adicción, trastorno de estrés postraumático, compromete la evaluación de las señales sociales en el ambiente (Pitkänen et al., 2003).

2.3 Ácido γ -amino-butírico (GABA) en la ansiedad

Es un neurotransmisor inhibitorio, tiene distribución ubicua y está presente en más del 50% de las sinapsis centrales (Ashton & Young, 2003; Cryan & Kaupmann, 2005). La neurotransmisión GABAérgica postsináptica a las vías monoaminérgicas en el hipocampo, núcleo accumbens, septo lateral, sustancia gris periacueductal y la amígdala es crucial en la ansiedad (Millan & Brocco, 2003). La amígdala tiene gran cantidad de receptores a GABA tipo A ($GABA_A$ R), por lo que es uno de los principales sitios de acción de las benzodiazepinas (BZD) (Niehoff & Kuhar, 1983). La ABL es la región primaria de aferencia cortical y talámica (Läck, Diaz, Chappell, DuBois, & McCool, 2007), y la neurotransmisión mediada por $GABA_A$ R induce efectos ansiolíticos (Scott Keith Sanders & Anantha Shekhar, 1995; S. K. Sanders & A. Shekhar, 1995). GABA activa dos clases de receptores en regiones involucradas en los trastornos de ansiedad como la amígdala, 1) *ionotrópicos* $GABA_A$ ($GABA_A$ R) y $GABA_C$ ($GABA_C$ R) y 2) *metabotrópicos* $GABA_B$ ($GABA_B$ R). Los receptores de GABA

tienen múltiples sitios de unión para BZD, bicuculina, picrotóxina, barbitúricos y otros anestésicos y se modulan alostéricamente. Los receptores inotrópicos son glicoproteínas integrales heterodiméricas con 5 subunidades que rodean a un canal de Cl⁻. El GABA_AR está constituido de varias subunidades ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \theta, \epsilon, \pi, \rho$), siendo las subunidades α y γ el sitio de unión de BZD (Nemeroff, 2003; Olsen, 2002; Wong & Snead, 2001). Se sugieren al menos 20 combinaciones de las subunidades para dar lugar a diferentes subtipos de GABA_AR (Rudolph & Möhler, 2006). Los receptores ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$) son selectivamente activados por muscimol, antagonizados competitivamente por bicuculina y no-competitivamente por picrotoxina. La selectividad de GABA_AR genera perfiles farmacológicos en diferentes regiones cerebrales, así los sitios de unión para diferentes fármacos depende de las combinaciones de las subunidades α y γ (Korpi, Gründer, & Lüddens, 2002). La densidad de los GABA_AR se modifica en estados de ansiedad y por agentes ansiolíticos (Millan & Brocco, 2003). La ABL está bajo el control tónico GABAérgico, así que el bloque de GABA, provoca un estado crónico de ansiedad, mediada por receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartato) (Shekhar, Sajdyk, Gehlert, & Rainnie, 2003). La aplicación de estímulos condicionantes en animales de laboratorio produce sobre-activación de la amígdala lo que lleva a trastornos de ansiedad (Quirk & Gehlert, 2003). Algunos GABA_AR involucrados en vías específicas de señalización en aspectos de conducta, que generan corrientes post-sinápticas inhibitoras en ABL están mediadas por $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del GABA_AR, mientras que en ACe sólo participan los GABA_AR que contienen $\alpha 2$ (Marowsky, Fritschy, & Vogt, 2004). La administración de

BZD aumenta la corriente postsináptica inhibitora tanto en la ABL como en ACe. Zolpiden (sedante no benzodiazepínico) mejora la corriente inhibitora en ABL y en ACe sólo actúa a concentraciones altas (Kang-Park, Wilson, & Moore, 2004). El receptor GABA_B (GABA_BR) es una proteína G heterodimérica, acoplada a canales de Ca²⁺ o K⁺. Hay evidencia de que ratones deficientes de los GABA_{B(1)}R presentan mayores niveles de ansiedad que los ratones silvestres (wt) en la prueba de claro-oscuro y presentan un efecto ansiolítico disminuido de BZD. Así, se sugiere que la activación de GABA_BR puede disminuir la ansiedad y que la administración de baclofeno (un agonista GABA_BR) produce efectos ansiolíticos, en crías de roedores disminuye el llamado a su madre por separación, disminuye el conflicto en Vogel (Cryan & Kaupmann, 2005; Jacobson & Cryan, 2008). Ratones deficientes de GABA_{B(1)}R tienen un fenotipo ansioso y efectos disminuidos a BZD, observado en diferentes pruebas de ansiedad (Mombereau et al., 2005; Mombereau, Kaupmann, van der Putten, & Cryan, 2004). En modelo animal baclofeno tiene efectos ansiolíticos y revierte la respuesta ansiogénica del síndrome de abstinencia a diazepam (File, Kenny, & Cheeta, 2000). Clínicamente, ha mostrado efecto ansiolítico en pacientes con abstinencia al alcohol, estrés postraumático y trastornos de pánico (Drake et al., 2003).

2.4 Glutamato en la ansiedad

El glutamato participa en la ansiedad por receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros provocan despolarización de la membrana plasmática. Están compuestos de 4 distintas subunidades, se subdividen en (Coyle, Leski, & Morrison,

2002 ; Simeone, Sanchez, & Rho, 2004): a) **rNMDA**receptores de ácido N-metil-D-aspartato; b) **rAMPA**receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico(GluR1 a GluR4); c) **rKainato**receptores de kainato, (GluR5 al GluR5 y KA1, 2). La administración de antagonistas a los receptores NMDA y no-NMDA (AMPA) reduce la ansiedad y presenta efectos antidepresivos (Miserendino, Sananes, Melia, & Davis, 1990; Poleszak et al., 2004). La modulación farmacológica en los receptores NMDA se da en diferentes sitios: I) de reconocimiento a glutamato; II) de reconocimiento a glicina insensible a estricnina; III) de reconocimiento a fenciclidina dentro del poro del canal y IV) un sitio facilitador de poliaminas(Wiley et al., 1998). En estudios preclínicos la administración de moduladores de los receptores NMDA, AMPA/kainato y receptores metabotrópicos pueden ejercer efectos ansiolíticos (Bergink, van Megen and, & Westenberg, 2004). Es probable que los compuestos con capacidad ansiolítica y antiestrés actúen a través de disminuir la transmisión glutamatérgica(Gorman, 2003), lo que se consigue por bloquear los receptores inotrópicos como el NMDA y los mGluR del grupo I. Se ha demostrado la participación de mecanismos glutamatérgicos, por la vía de los rNMDA en la ansiedad, ya que tanto antagonistas competitivos como no-competitivos muestran efectos ansiolíticos en diferentes modelos animales (Ferreira & Morato, 1996). El bloqueo del rNMDA por diferentes dosis de magnesio (Mg), induce un efecto ansiolítico sin afectar la actividad locomotora(Poleszak et al., 2004). La administración a ratas del antagonista no-competitivo del receptor NMDA, (+)-MK-801 (dizocilpina a 0.03 o 0.06 mg/kg), provoca un incremento en la exploración de

brazos abiertos del laberinto elevado en forma de cruz (LEC), indicando un efecto ansiolítico (Bertoglio & Carobrez, 2003). Ratas jóvenes que reciben MK-801 vía subcutánea muestran una disminución de sus niveles de ansiedad, apoyando la participación de los rNMDA en los procesos de ansiedad (Latysheva & Rayevsky, 2003). La administración hipocampal del antagonista de rNMDA, AP-7 (ácido amino fosfonoheptanoico), induce disminución en la exploración del LEC después de una sesión de estrés y una reducción del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada, evidenciando la participación de los rNMDA del hipocampo en trastornos psiquiátricos (Padovan & Guimarães, 2004). El uso de los antagonistas de los receptores NMDA como fármacos ansiolíticos es limitado debido a los efectos colaterales que inducen: ataxia, relajación muscular, deterioro en aprendizaje-memoria y acciones psicoticomiméticas (Chojnacka-Wójcik, Kłodzinska, & Pilc, 2001). No obstante, el manejo farmacológico-experimental de mecanismos glutamatérgicos es una herramienta relevante en la búsqueda del mecanismo de acción de nuevas sustancias útiles en el tratamiento de trastornos de ansiedad. Se ha sugerido que el bloqueo directo de los receptores inotrópicos puede ser un mecanismo viable en la búsqueda de nuevos tratamientos ansiolíticos. La administración aguda de cetamina (antagonista de rNMDA) a pacientes produce un inicio rápido del efecto antidepresivo, respuesta que dura algunos días (Zarate, Jr, Singh, Carlson, & et al., 2006). Los receptores AMPA/GLUK5 (kainato) se encuentran localizados en la ABL (Li, Chen, Xing, Wei, & Rogawski, 2001) son bloqueados no-selectivamente por el ácido LY293558 y selectivamente por el LY382884, ambas

sustancias tienen efecto ansiolítico demostrada en el modelo de conflicto de Vogel (A. Alt et al., 2006; Andrew Alt et al., 2007).

Los receptores metabotrópicos (mGluR) están acoplados a proteínas G y la generación de segundos mensajeros. Se han agrupado en 3 diferentes categorías (Coyle et al., 2002 ; Simeone et al., 2004): a) **Grupo I** (mGluR1 y mGluR5). Están acoplados a fosfolipasa-C (PLC), lo cual provoca la hidrólisis de fosfoinositoles y la liberación de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares; b) **Grupo II** (mGluR2 y mGluR3); c) **Grupo III** (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8). Los grupos II y III, están acoplados negativamente a la adenilatociclasa (Amiel & Mathew, 2007). La activación de los receptores mGluR tipo II produce ansiolisis en animales y humanos (Schoepp, Wright, Levine, Gaydos, & Potter, 2003). La regulación glutamatérgica es un blanco terapéutico del cual deben evaluarse los mecanismos metabotrópicos involucrados con este neurotransmisor. Análisis experimentales sugieren que los mGluR del grupo I están involucrados en procesos de estrés y ansiedad (Yap, Covington, Gale, Datta, & Miczek, 2005). El EMQMCM (antagonista de alta afinidad para mGluR1) (Löscher et al., 2006) penetra la barrera hematoencefálica e inhibe la respuesta de roedores durante la prueba de condicionamiento contextual al miedo (Pietraszek et al., 2005). El antagonista selectivo de mGlu1, JNJ16259685, un análogo metabólicamente estable de EMQMCM, produce una respuesta ansiolítica en el modelo de Vogel, pero no en el modelo de laberinto elevado en forma de cero (Steckler et al., 2005). La administración aguda de esta sustancia disminuye la actividad motora espontánea de las ratas y tiene una tendencia para incrementar este parámetro después de la

cesación con el tratamiento crónico (Steckler et al., 2005). EMQMCM o LY456236 no modifican la actividad motora, pero reducen la actividad motora vertical (Pietraszek et al., 2005)(Dravolina, Danysz, & Bessalov, 2006).Resultados a partir de técnicas inmuno-histoquímicas, indican que en regiones del sistema límbico involucradas en la ansiedad, se expresan los mGluR5 (Besheer & Hodge, 2004; Shigemoto et al., 1993). La administración sistémica a ratas del antagonista para los mGluR5 MPEP (Gasparini et al., 1999), provoca cambios conductuales como incremento en el tiempo y en el número de cruces a los brazos abiertos de un laberinto elevado, los cuales son parámetros de disminución de los estados de ansiedad (Spooren et al., 2000), también induce un efecto ansiolítico en la prueba de interacción social (Tatarczyńska et al., 2001). El MPEP es un potente antagonista de los mGluR5, induce ansiolisis evaluada en diferentes modelos conductuales, a través de un mecanismo no dependiente de GABA (Aleksandra Klodzinska et al., 2004).

Los mGluR del grupo II y III disminuyen la neurotransmisión glutamatérgica por inhibir la liberación de glutamato, de tal manera que existe la posibilidad de que sustancias que actúan como agonistas de estos receptores tengan efectos ansiolíticos. El LY354740, un agonista de los mGluR del grupo II tiene un buen perfil ansiolítico sin los efectos sedantes de las benzodiazepinas (Grillon, Cordova, Levine, & Morgan, 2003) y además es potente oralmente (Woltering et al., 2008). Otro ejemplo, es el efecto ansiolítico de la modulación alostérica del mGluR4 por PHCCC (Stachowicz, Kłak, Kłodzińska, Chojnacka-Wojcik, & Pilc, 2004). Recientemente se descubrió al AMN082 el cual es un compuesto que regula la actividad

glutamatérgica modulando alostéricamente los receptores mGluR₇ de la ABL y produce un efecto ansiogénico, lo que es opuesto al observado por la administración de S-3,4-DCPG (agonista selectivo de mGluR₈) en la amígdala produce un efecto ansiolítico en ratas (Palazzo, Fu, Ji, Maione, & Neugebauer, 2008; Ugolini, Large, & Corsi, 2008). La información presentada indica que la regulación y modulación farmacológica de los receptores glutamatérgicos, son un blanco prometedor para la terapéutica de los trastornos de ansiedad.

2.5 Tratamiento de los trastornos de Ansiedad

Para establecer un tratamiento adecuado es necesario el diagnóstico del tipo de trastorno de ansiedad y generalmente involucra la prescripción de más de un fármaco (Blanco, Antia, & Liebowitz, 2002; Nash & Nutt, 2007). En la Tabla 1 se agrupan los diferentes fármacos empleados en el tratamiento de los trastornos de ansiedad. Las benzodiazepinas han sido desde su aparición en la terapia clínica el grupo de fármacos ansiolíticos más empleados; el diazepam es la BZD más representativa del grupo (Davidson, 2004). Sin embargo, las ventajas del uso de este grupo de fármacos son parciales y muy limitadas debido a que presentan efectos secundarios: somnolencia diurna, mareo, sedación, disminución de la habilidad psicomotora, confusión, astenia muscular, trastornos de la memoria, pesadillas, tolerancia, adicción, síndrome de dependencia, interacción con otros medicamentos y las bebidas alcohólicas (Baldessarini, 1991). En la última década del siglo pasado, el tratamiento de la ansiedad incluyó el uso de antidepresivos como los inhibidores

selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI) lo que representó un avance terapéutico importante. También se ha establecido que los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos (ATC), inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina (SNRI) y azapironas son fármacos eficaces (Mauk, Peroutka, & Kocsis, 1988). A diferencia de las BZD, el inicio de la terapia con algunos antidepresivos causan un incremento en el estado de ansiedad y el efecto ansiolítico ocurre después de la administración subcrónica del medicamento (Rocca, Fonzo, Scotta, Zanalda, & Ravizza, 1997). Algunos efectos colaterales asociados a los antidepresivos son náusea, diarrea, insomnio, agitación, disfunción sexual, hipotensión postural. El síndrome de abstinencia que se presenta con el uso crónico de antidepresivos es menos severo que con las BZD, aunque se ha reportado que la suspensión del tratamiento produce recaídas. La interrupción del uso de estos fármacos puede provocar mareos, tembor, vértigo, parestesia, confusión, problemas de memoria, dolor de cabeza e irritabilidad (Nash & Nutt, 2007).

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de los trastornos de ansiedad.

Ansiolíticos	Antidepresivos
<p>Benzodiazepinas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Loracepam • Clonazepam • Diacepam • <p>Agonistas del receptor 5-HT_{1A}</p> <ul style="list-style-type: none"> • Buspirona 	<p>Antidepresivos tricíclicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Imipramina • Clomipramina • Amitriptilina <p>Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fenelzina <p>Inhibidores selectivos de la recaptura de</p>

	<p>serotonina (ISRS)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paroxetina • Escitalopram • Fluoxetina • Sertralina • Citalopram <p>Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina (ISRSN)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Venlafaxina
--	---

2.6 *Galphimia glauca*Cav, Sinónimo: *Thryallis glauca* (Cav.) Kuntze

Sus nombres comunes son huachácata, nacáchata o vachácata en Michoacán; calderona amarilla, flor de diciembre en Michoacán y Guerrero; ramo de oro en Jalisco; árnica de raíz, flor de estrella, xaxaxaoti en Morelos (Figura 1). Se ubica en altitudes desde 0-2350 msnm, en los estados de Sonora, Tamaulipas, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Morelos, Guerrero, Chiapas. Es un arbusto siempre verde desde 0.7-4 m de altura, ampliamente ramificado, el tallo de las ramas presenta coloración rojiza cuando es adulto, presenta hojas simples, glabras y opuestas; sus flores son amarillas en forma de estrella que aparecen en panículas en posición axilar o terminal y están presentes todo el año (Martínez, 1969; Monroy-Ortiz & Castillo-España, 2007; Rzedowski & Equihua, 1987).



Figura 1. Arbusto de *Galphimia glauca* en floración.

2.7 Usos y farmacología

Se reporta su uso medicinal en el tratamiento de trastornos nerviosos (Estrada, 1985). El extracto metanólico de hojas de *G. glauca* es capaz de potenciar el efecto hipnótico del pentobarbital, de manera dosis-dependiente y a las dosis de 500 mg/kg vía *i.p.*, incrementa el tiempo de latencia de convulsiones inducidas con estriquina, además de reducir la mortalidad de ratones en un 40 % en la prueba de pentilentetrazol. Lo que indica que este extracto posee efectos depresores del sistema nervioso central (J. Tortoriello & Lozoya, 1992). De este extracto fue aislado el triterpenogalphimina-B (G-B), que no posee actividad anticonvulsivante pero potencia el tiempo de narcosis inducido con pentobarbital e inhibe el reflejo peristáltico del íleon aislado de cobayo (J. Tortoriello & Ortega, 1993). A través de estudios de electrofisiología, se demostró que G-B administrado sistémicamente (0.5,

1.0, 2.5 mg/kg, i.p.) y localmente por microiontoforesis (1 M, pH 5.7) a ratas, induce una reducción de larga duración en la frecuencia de disparo espontáneo de neuronas dopaminérgicas del área tegmentalventral, pero no induce cambios sobre la corteza somatosensorial (Jaime Tortoriello, Ortega, Herrera-Ruíz, Trujillo, & Reyes-Vázquez, 1998). Los resultados tuvieron una gran relevancia debido a que el AVT es el principal centro dopaminérgico responsable de la innervación de la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, amígdala y la región entorrinal y estas áreas están implicadas en la fisiopatología de la ansiedad, mecanismo de reforzamiento de estímulos biológicos y de fármacos, además es el blanco de sustancias de abuso (Charney, 2003; Tzschentke, 2001). Mediante la técnica de registros intracelulares en rebanadas de cerebro de rata, se observó que diferentes concentraciones de G-B (1 μ M-5 μ M) inducen una reducción en la frecuencia de los potenciales postsinápticos miniatura (mEPSCs) pero no la amplitud. Cuando G-B se administró con GABA (1-100 nM) se redujo significativamente la amplitud del estímulo de EPSCs, pero al administrarse bicuculina (10 μ M) y el bloqueador del receptor GABA_B saclofen (200 μ M) sólo disminuyó el efecto de GABA y no el efecto depresor de G-B. De estos resultados se dedujo que la acción depresora de G-B no está mediada a través de un mecanismo GABAérgico (Prieto-Gómez, Tortoriello, Vázquez-Alvarez, & Reyes-Vázquez, 2003). Se logró demostrar que el extracto metanólico de *G. glauca* (estandarizado con 8.3 mg/g de G-B) posee un efecto ansiolítico sobre ratones en el laberinto elevado en forma de cruz, además de un efecto ansiolítico dosis-dependiente en la prueba de claro-oscuro el cual no se atribuye necesariamente a la

concentración de G-B en el extracto (M. Herrera-Ruiz, J. E. Jiménez-Ferrer, et al., 2006). Las galphiminas G-B, G-E y G-A, contenidas en el extracto metanólico ejercen una actividad ansiolítica en el mismo modelo, los principales factores determinantes para que se lleve a cabo la actividad ansiolítica son la presencia de grupos hidroxilo libres en las posiciones C4, C6 y C7, así como la presencia de la doble ligadura en el anillo A(González-Cortazar, Tortoriello, & Alvarez, 2005; Maribel Herrera-Ruiz et al., 2006). Finalmente, la administración subcrónica de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la planta a 2.5 g/kg, vo, no tienen efecto tóxicos o genotóxicos(Aguilar-Santamaría et al., 2007).

3. Planteamiento del problema

Debido a un notable incremento en la prevalencia de la ansiedad a nivel mundial (del 0.1 al 16.9%) y los amplios efectos secundarios indeseables de los fármacos usados para su tratamiento, resulta de gran relevancia la búsqueda de sustancias biológicamente activas de origen vegetal que puedan reducir los trastornos de ansiedad. Como antecedentes existen reportes que indican que G-A presenta actividad ansiolítica en modelos animales pero no se han realizado investigaciones enfocadas a evaluar su interacción con los sistemas de neurotransmisión que participan en la aparición de la ansiedad. En el presente proyecto se realizó un análisis de las acciones del ansiolítico G-A y su interacción con el sistema GABAérgico a través del uso de diferentes fármacos moduladores de los diferentes GABA_AR y GABA_BR. Es también reconocida la participación glutamatérgica en los trastornos de la ansiedad y está mediada por sus receptores rNMDA y mGluR del

grupo I, específicamente en algunas estructuras como la ABL y el hipocampo. Es de gran importancia conocer cuáles son los posibles mecanismos de acción por los que se produce el efecto ansiolítico de Galphimina-A por lo que se requiere caracterizar la interacción de G-A sobre los sistemas glutamatérgicos y GABAérgicos que involucran la participación de los receptores rNMDA, mGluR5, GABA_AR y GABA_BR en la amígdala basolateral de rata, mediante registros electrofisiológicos extracelulares. Debido a que el análisis de la actividad ansiolítica de G-A no es posible modelarla en un estudio electrofisiológico, se llevó a cabo la evaluación del efecto ansiolítico de diferentes dosis de G-A y su interacción con los moduladores GABAérgicos y Glutamatérgicos, utilizando el modelo conductual de laberinto elevado en forma de cruz, además de evaluar la conducta motora espontánea en campo abierto.

4. Pregunta de investigación

¿El efecto ansiolítico de G-A es debido a una interacción farmacológica de esta sustancia con los sistemas de neurotransmisión GABAérgica y/o Glutamatérgica de la amígdala basolateral?

5. Hipótesis

El efecto ansiolítico de galphimina-A se observará en el modelo de laberinto elevado en forma de cruz, dicho efecto estará mediado por la modulación de la frecuencia de descarga neuronal en neuronas de la amígdala basolateral, a través de interacción farmacológica de este triterpeno con antagonistas GABAérgicos.

6. Objetivo general

Caracterizar la interacción farmacológica de G-A con algunos receptores GABAérgicos y Glutamatérgicos involucrados en los mecanismos que subyacen a los desórdenes de ansiedad además de evaluar los efectos sobre la actividad motora espontánea

.

6.1 Objetivos específicos

1. Obtener galphimina-A mediante una transformación de galphimina-Eobtenida a partir de un extracto metanólico de las partes aéreas de *Galphimia glauca*.
2. Evaluar y analizar el tipo de interacción farmacológica, mediante la construcción de curvas dosis-respuesta, de la administración intravenosa del ansiolítico G-A, con los fármacos que modulan el sistema GABAérgico: diazepam, bicuculina, faclofen y flumazenilo; y glutamatérgico: NMDA, MK-801, MPEP sobre la frecuencia de descarga neuronal de la ABL de ratas SpragueDawley.
3. Evaluar la interacción farmacológica de la administración oral de diferentes dosis del ansiolítico G-A y los diferentes moduladores químicos del sistema de neurotransmisión GABAérgica sobre ratones expuestos a los modelos conductuales del laberinto elevado en forma de cruz y de actividad motora espontánea en campo abierto.

7. Material y métodos

7.1 Material vegetal

Se colectaron las partes aéreas de *Galphimia glauca* Cav. (Malpigiaceae) de una parcela experimental ubicada en Xochitepec, Morelos, México. Los especímenes fueron identificados en el herbario IMSS por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras (IMSSM-8646). El material vegetal se sometió a un proceso de secado durante 10 días en un cuarto en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Una vez seco el material vegetal fue procesado en un molino mecánico (Pulvex®) hasta obtener partículas de un tamaño aproximado de 2-5 mm.

7.2 Obtención de un pool de galphiminas

Para la obtención de una fracción rica en galphiminas, las partes aéreas de la planta fueron maceradas con *n*-hexano para la eliminación de compuestos de baja polaridad, posteriormente fueron sometidas a extracción con una mezcla de acetato de etilo y metanol (50:50, 3 veces) (González-Cortazar et al., 2005). El extracto obtenido fue resuspendido en solventes con polaridad ascendente de la siguiente manera: *n*-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. El disolvente fue eliminado bajo condiciones de destilación a presión reducida en un rotaevaporador Heidolph-Laborota 4000 (Alemania). Finalmente se obtuvieron fracciones de *n*-hexano, acetato de etilo, cloroformo y metanol. Esta última es la fracción denominada pool de galphiminas (Figura 2).

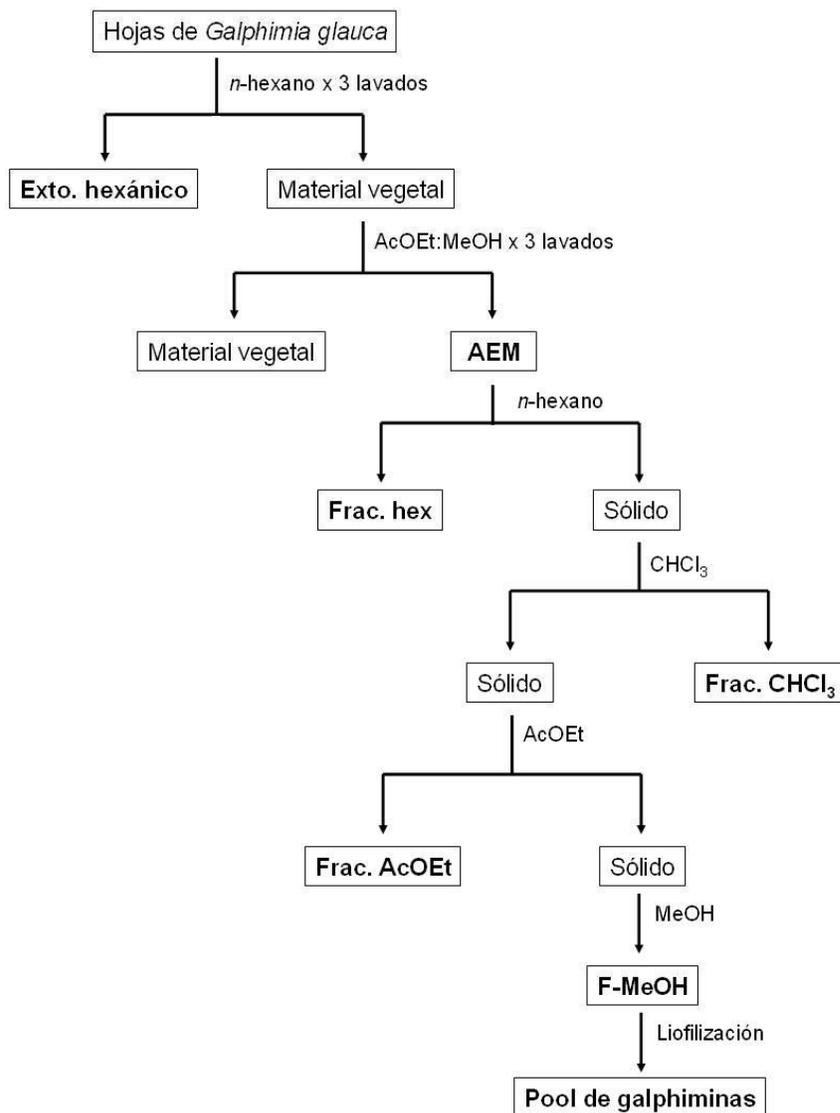


Figura 2. Estrategia experimental para obtener el pool de galphiminas.

7.2.1 Aislamiento e identificación de G-A

La fracción denominada pool de galphiminas fue sometida a un fraccionamiento en una columna gravitacional de gel de sílice, y la fase móvil consistió en una mezcla de disolventes: cloroformo (CHCl₃) 100 %, cloroformo:acetona (CHCl₃:CH₃COCH₃) 90:10 %, CHCl₃:CH₃COCH₃ 80:20 %, CHCl₃:CH₃COCH₃ 70:30 %, CHCl₃:CH₃COCH₃ 50:50

%, metanol (MeOH) 100 %. Las fracciones que se identificaron por presentar G-E (por su coloración morada en CCF) fueron reunidas y sometidas a un proceso de percolación con carbón activado para eliminar la coloración, la fase móvil empleada consistió en una mezcla de disolventes:hexano:acetato de etilo (hex:AcOEt) 70:30 %, (hex:AcOEt) 50:50 %, MeOH 100%.

Para transformar G-E en G-A, el producto seco que contenía G-E se disolvió (2 mg/mL de G-E) en una solución saturada de bicarbonato de potasio (KHCO_3). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación por 30 min (100 rpm). Posteriormente el producto fue separado en un embudo de separación en donde se generaron dos fases de disolvente una de acetato de etilo para remover la G-E no transformada, y otra de metanol para coleccionar G-A. Los cristales de G-A fueron sometidos a cromatografía de líquidos de alta resolución. La fracción con G-A fue inyectada en un volumen de 700 μL en un equipo de HPLC semipreparativo (Waters 6200) con un detector de arreglo de diodos ajustado a 220 nm. Se utilizó una columna Xterra (Waters), la fase móvil fue diclorometano-metanol 85:15 a un flujo constante, con una corrida de 12 minutos y un tiempo de retención de 6.76 minutos. La identificación de G-A se realizó por RMN comparando los espectros con datos ya publicados (González-Cortazar et al., 2005). G-A fue almacenada a 4° C protegida de la luz hasta su uso.

7.3 Animales

Se emplearon ratas macho SpragueDawley con un peso de 250-300 g el día de la experimentación, para realizar los registros electrofisiológicos. Para el LEC y CA se emplearon ratones macho cepa ICR (35 g). Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio (12:12 h de ciclo luz-oscuridad, con acceso libre al agua y alimento).

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y se le asignó el número R-2010-1701-23.

7.4 Sustancias empleadas

En el protocolo se emplearon las siguientes sustancias: **Tween 20** al 0.5% como vehículo; **G-A** (0.125, 1.0, 1.5, 3.25, 7.5, 15, 30, 45 mg/kg, disuelto en tween 20 al 0.5 %); moduladores del sistema GABAérgico, **Diacepam** (DZP, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 10 mg/kg, Pfizer) fue empleado como una sustancia ansiolítica y sedante, el cual es un modulador alostérico del GABA_AR; **Flumazenilo** (FMZ, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, y 6 mg/kg) antagonista a benzodiazepinas. **Picrotóxina** (PTX, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 2, 3, 6 mg/kg), como antagonista no competitivo del GABA_AR el cual bloquea el canal del ion cloruro; **Pentilentetrazol** (PTZ, 0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15 mg/kg), el cual tiene una acción no del todo conocida pero es un estimulante del SNC e induce un efecto

ansiolítico. **Bicuculina**(BICC, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 5, 6 mg/kg), como antagonista competitivo del GABA_AR;**(+)**; **Faclofén** (FCF, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg) antagonista del GABA_BR. Moduladores del sistema glutamatérgico, **2-metil-6-(feniletinil)piridina**(MPEP, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg), como antagonista selectivo de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos del tipo mGluR5; **Ácido N-metil-D-aspartato**(NMDA, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg), como agonista de los receptores inotrópicos a glutamato; **Dizocilpina**(MK-801, 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg), como antagonista no competitivo de los receptores glutamatérgicos inotrópicos del tipo NMDA; **Uretano**, anestésico para realizar los registros electrofisiológicos. Todas las sustancias moduladoras de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico fueron compradas a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

7.5 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC), campo abierto (CA)

Experimentos conductuales. El LEC es utilizado en la búsqueda de tratamientos contra la ansiedad (Zhang, 2004), es un modelo que mide la tasa de aproximación contra la evitación, al presentar una selección entre un ambiente que es seguro (brazos cerrados del laberinto) y un espacio que parece novedoso pero con un alto nivel de riesgo (incremento en la exploración de los brazos abiertos) (File et al., 2000). En 1987 Lister hizo el experimento usando ratones suizos, y encontró que este modelo es también útil para evaluar la disminución de la ansiedad y la generación de ésta (Lister, 1987). Aunque los modelos animales no representan

todos los aspectos de la ansiedad de los humanos se vinculan con ciertos tipos de ansiedad, y constituyen una herramienta para la comprensión del probable mecanismo de acción ansiolítica de diferentes sustancias (Bourin, 2015).

El CA fue descrito para el estudio de la emocionalidad en ratas (Archer, 1973), el procedimiento consiste en colocar al roedor, a un medioambiente desconocido en donde la posibilidad de escape se previene por rodear el campo con paredes (Walsh & Cummins, 1975). El CA es ahora uno de los procedimientos más populares para investigar la conducta animal, sobre todo la valoración de la actividad motora (Prut & Belzung, 2003).

Determinación de la curva dosis-respuesta de G-A como ansiolítico en LEC y actividad motora espontánea en C-A. Se llevó a cabo la caracterización farmacológica de G-A en nueve grupos de 8 ratones, a los ocho primeros grupos se les administraron dosis crecientes de G-A (1.0, 1.5, 3.0, 6.0, 7.5, 15, 30, 45mg/kg, vo) una hora antes de los ensayos iniciando por LEC seguido de CA, el noveno grupo recibió el vehículo. Las curvas dosis-respuesta con la interacción de G-A con los diferentes fármacos se detallan en la Tabla 2, estos fármacos se administraron 30 minutos después de la aplicación de G-A.

Tabla 2. Diseño experimental para los modelos de actividad ansiolítica y motora (LEC y CA).

Fármacos	Dosis (mg/kg)	Interacción de G-A con fármacos GABAérgicos(mg/kg, i. p.)
G-A	1.0, 1.5, 3.0, 6.0,	

	7.5, 15, 30, 45 (vo)	
BICC	5.0 (i.p.)	G-A 30; 5.0 BICC
PTX	2.0(i.p.)	G-A 30; 2.0 PTX
PTZ	10(i.p.)	G-A 30; 10 PTZ

7.6 Registros de actividad extracelular en rata íntegra

Se pesaron y anestesiaron las ratas con uretano (1.5 mg/kg), se introdujo un catéter intravenoso (Punzocat, 24 G x 3/4", 0.70 x 20 mm) en alguna de las venas femorales, lo cual permitió la administración de los fármacos. Enseguida los animales se colocaron y fijaron por medio de unas barras de metal, en un aparato estereotáxico (Stoelting Co), colocado dentro de una cámara de Faraday, que tiene la finalidad de aislar el ruido eléctrico ajeno al registro celular (Figura 3). Para introducir el electrodo de registro y el de referencia, se limpió la piel que cubre el cráneo, de aproximadamente 2 cm para descubrir el hueso y se localizarán las coordenadas estereotáxicas para la amígdala basolateral, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 2014). Éstas son 0.8-1.0 mm posterior del punto bregma, lateral 4.5-5.5 mm y de profundidad 8.2-8.7 mm (Figura 4). Los electrodos de tierra y referencia se colocaron cercanos al sitio de registro. El electrodo de registro con un diámetro en la punta de aproximadamente 1 µm, se llenó con una solución saturada de NaCl 2.0 M con el colorante "verde rápido", éste se hizo pasar a través del trepano y se procedió a buscar los potenciales de acción de la amígdala basolateral, se dejó un periodo de 20 min de estabilización y en seguida se tomó un registro basal de 3 min, posteriormente se administró el tratamiento que corresponda. El electrodo de registro está conectado a una sonda de alta impedancia (Grass) y ésta a su vez a un amplificador (Grass P5 AC) acoplado a una fuente de poder (Grass

RPS 107). La señal de actividad eléctrica se visualizó en un osciloscopio (Tektronic TDS 3012) y fue transmitida al programa AxoScope versión 1.1 (Axoninstruments) para su análisis.

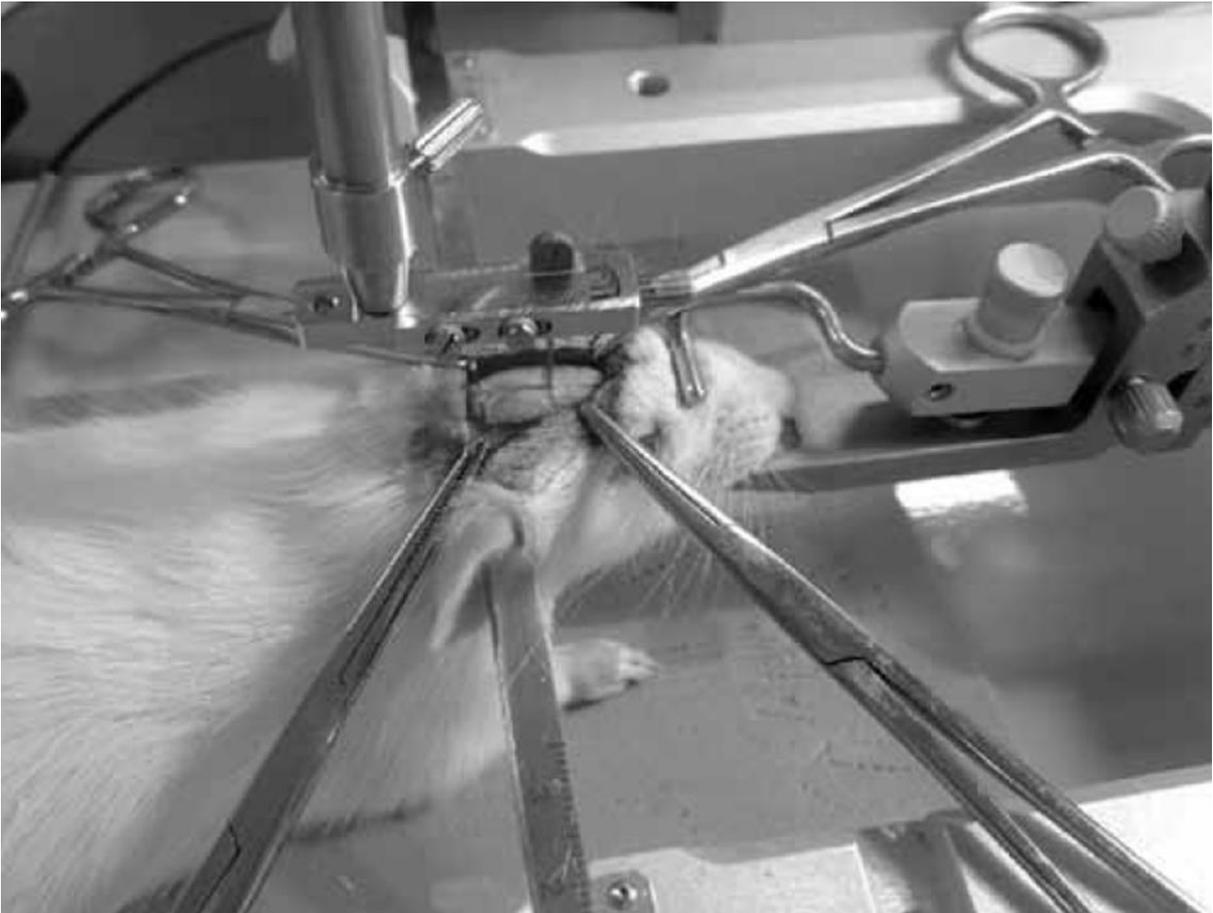


Figura 3. Implantación de los electrodos mediante cirugía estereotáxica.

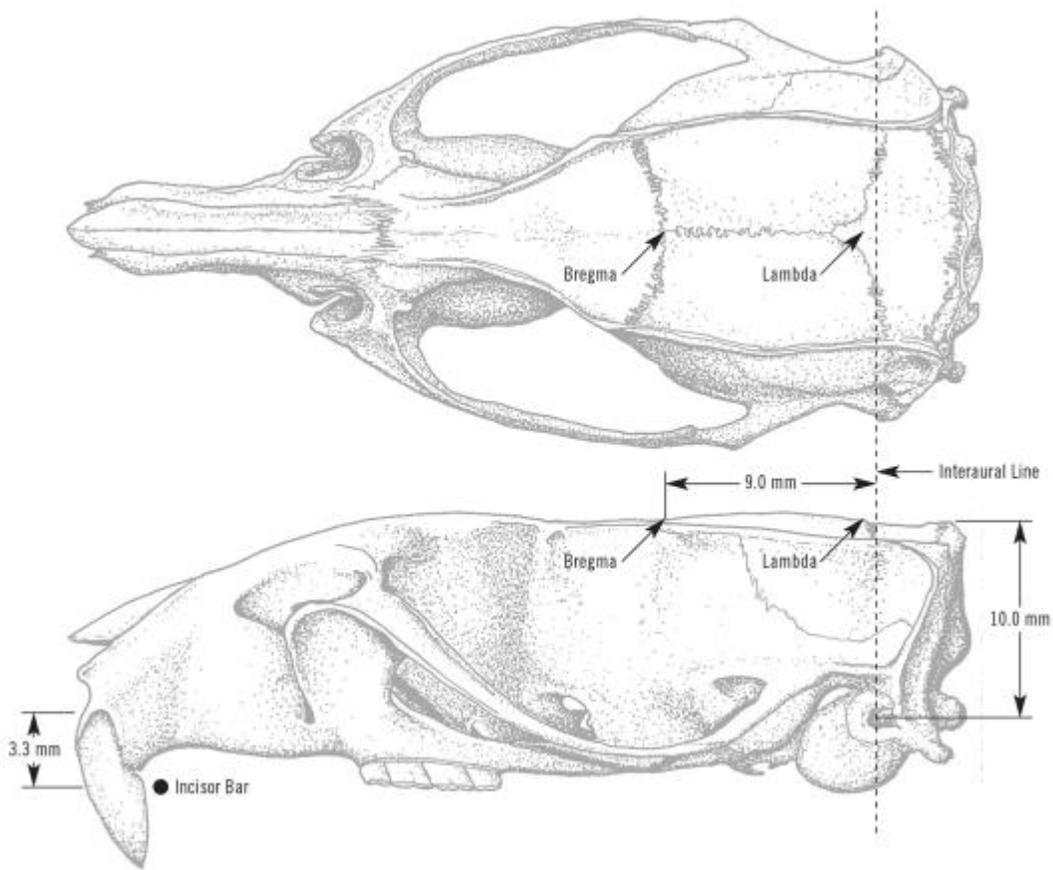


Figura 4. Vistas dorsal y lateral de un cráneo de una rata Wistar macho. Las posiciones del punto bregma y lambda se muestran en la vista lateral.

7.7 Registro de la frecuencia de disparo en la región del ABL

Se determinó la curva dosis-respuesta de G-A a través de analizar la frecuencia de disparo de la amígdala basolateral. Se formaron grupos de 6 ratas, a las cuales se les administró dosis acumulativas en orden creciente en \log_2 de G-A (0.75, 1.5, 3.0, 6.0 y 12.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, *i.v.*) en administraciones sucesivas, en cada dosis se realizó el registro electrofisiológico. También se determinó la curva dosis-respuesta para cada uno de los fármacos y su interacción con G-A, bajo el esquema que se presenta en la Tabla 3. Una vez anestesiadas, a las ratas se les administró por vía endovenosa (a

través de una cánula), los tratamientos correspondientes a diferentes dosis. Para cada animal se hizo un esquema de administración de dosis acumulativas, es decir, se administró la dosis más baja al fármaco que le correspondía y con intervalos de 1 min, se administraron dosis crecientes. En el caso de la interacción, los animales fueron pre-tratados con los antagonistas respectivos, se registraron la respuesta y a los 3 minutos de esta administración se inició con el esquema de las dosis acumulativas de los agonistas o de la sustancia problema (G-A).

Tabla 3. Diseño experimental para los modelos de actividad electrofisiológica en ABL.

Fármacos	Dosis acumulativas (mg/kg, i.v.)	Interacción de G-A con los fármacos GABAérgicos (mg/kg, i.v.)
G-A	0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0	
DZP	0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 10	G-A 0.125; 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 10 DZP
FMZ	0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0	G-A 0.125; 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 FMZ
BICC	0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0	G-A 0.125; 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 BICC
PTX	0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0	G-A 0.125; 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 PTX
PTZ	0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15	G-A 0.125; 0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15 PTZ
PHC	0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0	G-A 0.125; 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 FCF

G-A= Galphimina-A, DZP= diazepam, FMZ= flumazenilo, BICC= bicuculina, PTX= picrotóxina, PTZ= pentilentetrazol, FCF= faclofén

Los grupos estuvieron constituidos de al menos 6 animales cada uno; los tratamientos se administraron vía intravenosa (*i.v.*). El grupo control recibió una solución del vehículo Tween 20 al 0.5%.

7.8 Registros conductuales

Para el LEC se empleó un laberinto elevado en forma de cruz de acrílico con el centro de 5 X 5 cm, los brazos abiertos y cerrados de 30 cm de largo X 5 cm de ancho; la altura de las paredes de los brazos cerrados de 15 cm (Figura 3). Los animales fueron colocados en el centro del laberinto y se registraron por 5 min los parámetros de: tiempo de permanencia en brazos abiertos (TA) y brazos cerrados (TC), además de algunos parámetros etológicos. Un aumento en TA y por tanto en el porcentaje de TA es indicativo de disminución de la ansiedad.



Figura 5. Dispositivo del Laberinto Elevado en forma de Cruz.

Para actividad motora espontánea, se utilizó un campo cuadrulado de acrílico, durante 5 min (Figura 4), los animales fueron colocados en el centro del equipo y se observó la locomoción horizontal (número de cruces de líneas de cada cuadrante en el piso), frecuencia de estiramientos verticales (actividad vertical) y número de veces que el animal se acicala. Se formaron grupos de ocho animales.



Figura 6. Dispositivo del Campo Abierto.

7.9 Análisis farmacológico

El análisis de las interacciones farmacológicas del ansiolítico G-A con los diferentes sistemas de neurotransmisión en los modelos de electrofisiología y conductuales, se llevó a cabo mediante la construcción de curvas dosis-respuesta, calculando parámetros farmacodinámicos como la $E_{máx}$ y empleando ecuaciones de

linearización, en cada caso, para determinar el tipo de antagonismo o agonismo entre G-A y los diferentes fármacos moduladores de cada sistema neuronal. Además de construir gráficas de frecuencia de disparo de la ABL y curvas de porcentaje de respuesta de parámetros como el tiempo y número de entradas de los ratones a los brazos abiertos de un laberinto en forma de cruz.

7.10 Análisis histológico

Al final del registro electrofisiológico, se hizo pasar una corriente positiva a través del electrodo de registro con el fin de marcar la zona de registro con el colorante, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico. La ratas fueron perfundidas por vena femoral con una solución amortiguadora de fosfatos a pH=8, se extrajo el cerebro y se realizaron rebanadas de 700 μm para verificar la zona de registro. Aquellos registros que correspondían a la amígdala basolateral fueron considerados para el análisis farmacológico (Figura 7).

7.11 Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de porcentaje del tiempo transcurrido en los brazos abiertos y porcentaje del número de entradas a los brazos abiertos de ratones en el modelo de LEC con la prueba ANOVA. Para determinar la diferencia entre grupos y dentro de grupos se utilizó una postprueba de Dunnet. Para analizar el índice de descarga de la ABL de las dosis acumulativas se realizaron pruebas de *t* de Student.

8.2 Obtención de un pool de galphiminas

Se obtuvieron 189.2 g de un polvo de color verde oscuro que corresponde a la fracción rica en galphiminas, con un rendimiento de 2.6%.

8.2.1 Aislamiento e identificación de G-A

Del total del pool de galphiminas 150 g fueron sometidos a una separación por cromatografía en una columna abierta, estos se adsorbieron con 300 g de sílica gel (1.09385.9025 MERK®; 0.040-0.063 mm). Se empleó un gradiente de cloroformo, acetona y metanol. Se obtuvieron fracciones de 500 mL y por su similitud química en cromatografía en capa fina (CCF) se reagruparon las fracciones (Tabla 4).

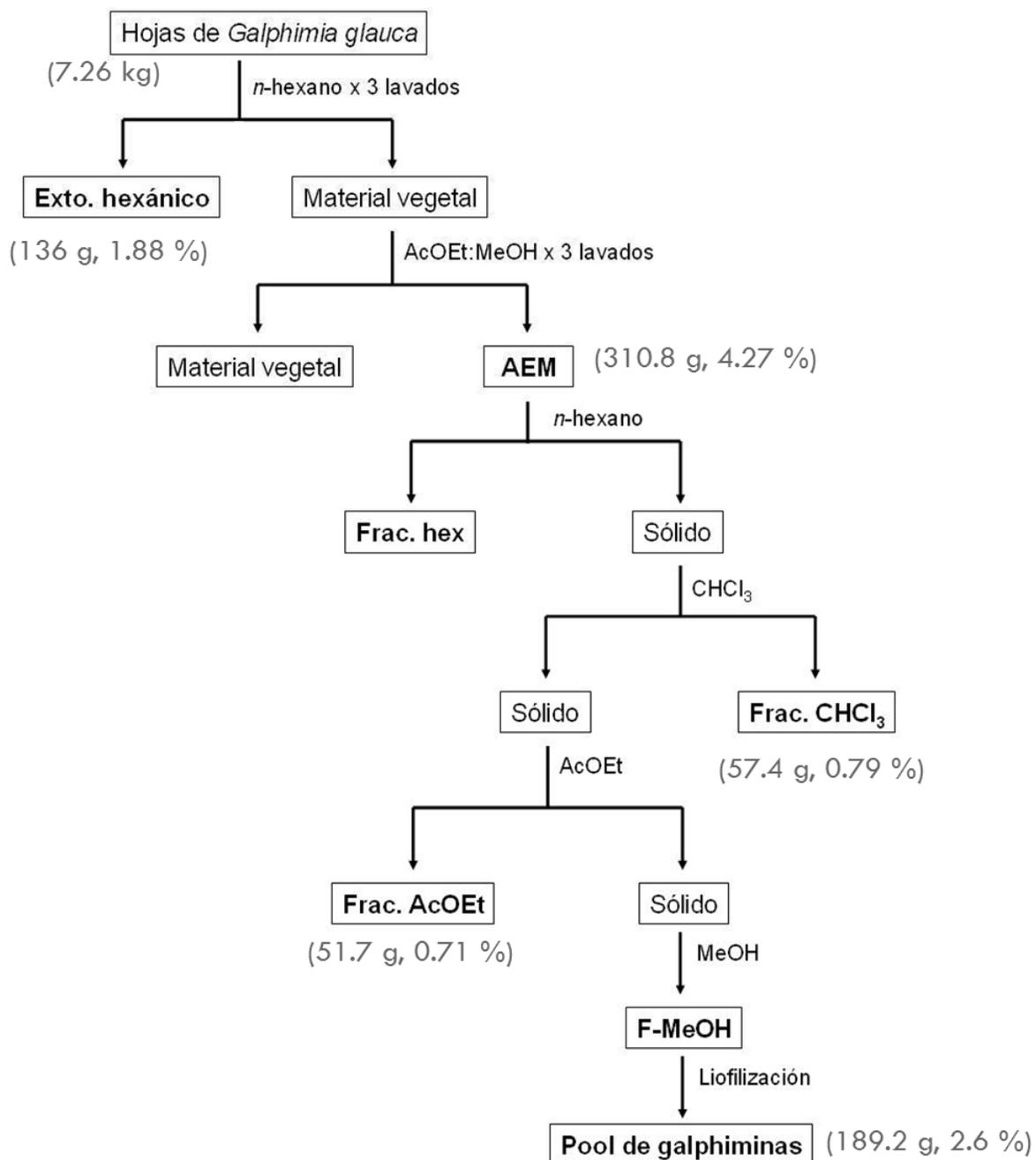


Figura 8. Cantidad y rendimientos obtenidos en la estrategia de extracción del material vegetal.

Tabla 4. Fraccionamiento del pool de galphiminas.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reagrupadas
CHCl ₃	100	1-20	A (1-3) B (4-19)
CHCl ₃ :CH ₃ COCH ₃	90:10	21-27	C (20-24) D (25-27)
CHCl ₃ :CH ₃ COCH ₃	80:20	28-31	E (28-32)
CHCl ₃ :CH ₃ COCH ₃	70:30	32-38	F (33-36)
CHCl ₃ :CH ₃ COCH ₃	50:50	39-44	G (37-42) H (43-44)
MeOH	100	45	I (45)

Se obtuvieron 100 g de la fracción B (rendimiento del 1.37 %), los cuales fueron sometidos a una percolación con carbón activado en una columna gravitacional, se agregaron 200 g de carbón activado y 700 g de sílica gel (1.09385.9025 MERK®; 0.040-0.063 mm) el sistema de elución empleado fue un gradiente de hexano y acetato de etilo (Tabla 5). Se colectaron fracciones de 500 mL y por su similitud química en CCF se reagruparon las fracciones.

Tabla 5. Fraccionamiento de la fracción B obtenida del pool de galphiminas.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reagrupadas
Hex:AcOEt	70:30	1-8	I (1-8) II (9-11)
Hex:AcOEt	50:50	9-16	III (12-16)
Hex:AcOEt + MeOH (1)	50:50 + 50 mL	17-32	IV (17-48)
Hex:AcOEt + MeOH (2)	50:50 + 100 mL	33-45	
Hex:AcOEt + MeOH (3)	50:50 + 200 mL	46-48	

(1) Se agregaron 50 mL de MeOH por cada litro de la mezcla hex:AcOEt

(2) Se agregaron 100 mL de MeOH por cada litro de la mezcla hex:AcOEt

(3) Se agregaron 200 mL de MeOH por cada litro de la mezcla hex:AcOEt

De la fracción IV se obtuvieron 7.9 g (rendimiento del 0.10 %), esta fracción contenía en mayor abundancia G-E por lo que se puso a reaccionar con una solución saturada de KHCO_3 , la fracción se sonicó durante 30 min y se obtuvo G-A y un precipitado, la muestra se filtró y se obtuvo un peso de 6.55 g (rendimiento del 0.08 %). Para purificar G-A de esta muestra, se sometió a un nuevo fraccionamiento en una columna gravitacional y se agregaron 154 g de sílica gel (1.09385.9025 MERK®; 0.040-0.063 mm), el sistema de elución empleado fue un gradiente de CHCl_3 y CH_3COCH_3 se obtuvieron fracciones de 300 mL y por su similitud en CCF se reagruparon (Tabla 6). Se colectaron fracciones de 300 mL y por su similitud química en CCF se reagruparon las fracciones.

Tabla 6. Fraccionamiento de fracción IV.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reagrupadas
CHCl_3	100	1-15	a (1) b(2) c(3) d (4-6) e (7-14) f (15)
$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COCH}_3$	90:10	16-26	g (16-17) h (18-20) i(21-22) j (23-28)
$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COCH}_3$	80:20	27-36	k (29-34)
$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{COCH}_3$	70:30	37-49	l (35-42) m (43-48) n(49)
MeOH	100	50	ñ (50)

La fracción g presentaba una mayor abundancia de G-A, de esta fracción se obtuvo un peso de 2.8 g (rendimiento del 0.03%) para eliminar los compuestos menos polares a G-A de la muestra se agregó hex y CHCl_3 y se sonicó durante 40 min. Los cristales de G-A fueron sometidos a cromatografía de líquidos de alta resolución. La fracción con G-A fue inyectada en un volumen de 700 μL en un equipo de HPLC semipreparativo (Waters 6200) con un detector de arreglo de diodos ajustado a 220 nm. Se utilizó una columna Xterra (Waters), la fase móvil fue diclorometano-metanol 85:15 a un flujo constante, con una corrida de 12 minutos y un tiempo de retención de 6.76 minutos (Figura 9).

Una porción de la muestra g se disolvió con metanol deuterado (CD_3OD) y se mandó a analizar por medio de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) empleándose tetrametilsilano como referencia interna. Se utilizó un espectrómetro de RMN multinuclear de 300 MHz (ASX300®, Bruker); el espectro obtenido (Figura 9) fue comparado con espectros de G-A publicados (González-Cortazar et al., 2005).

G-A

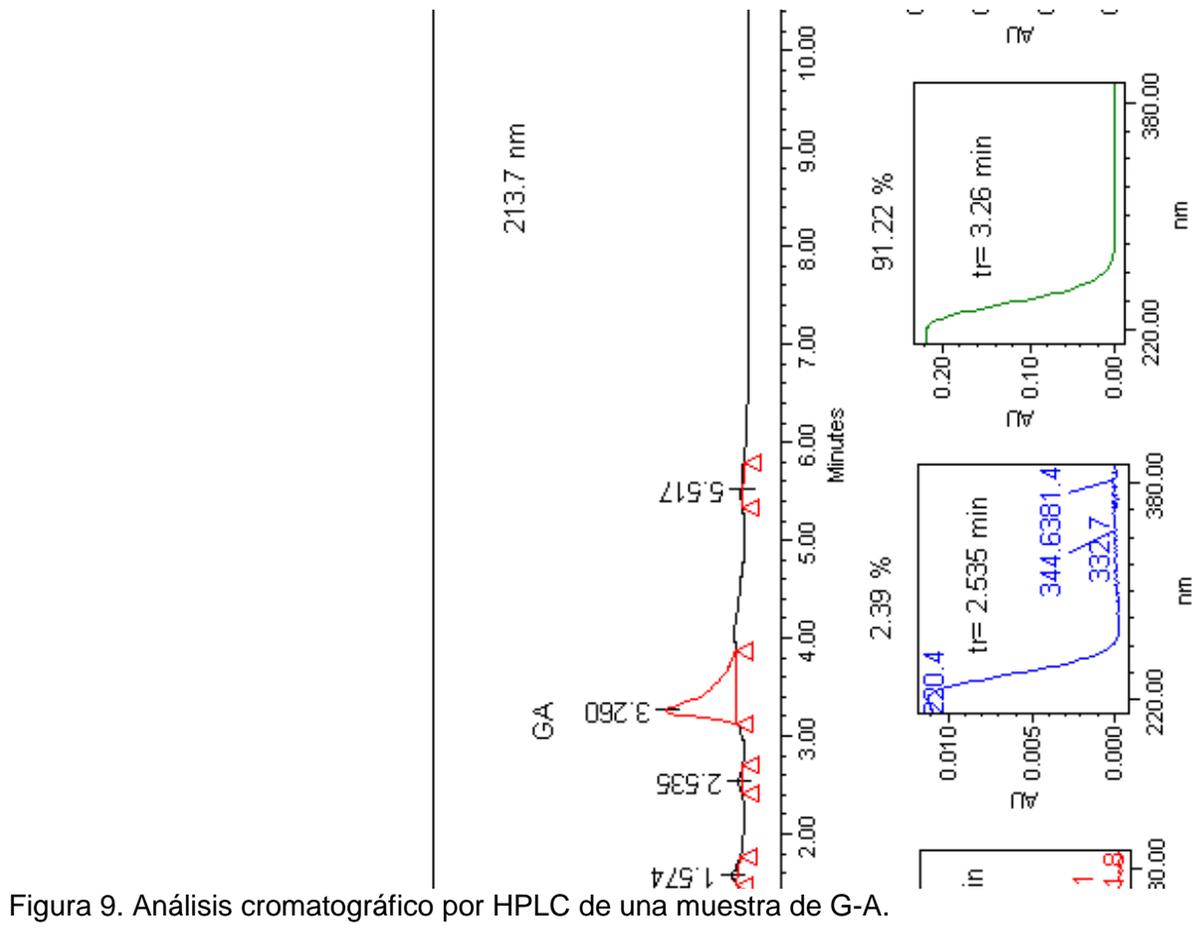


Figura 9. Análisis cromatográfico por HPLC de una muestra de G-A.

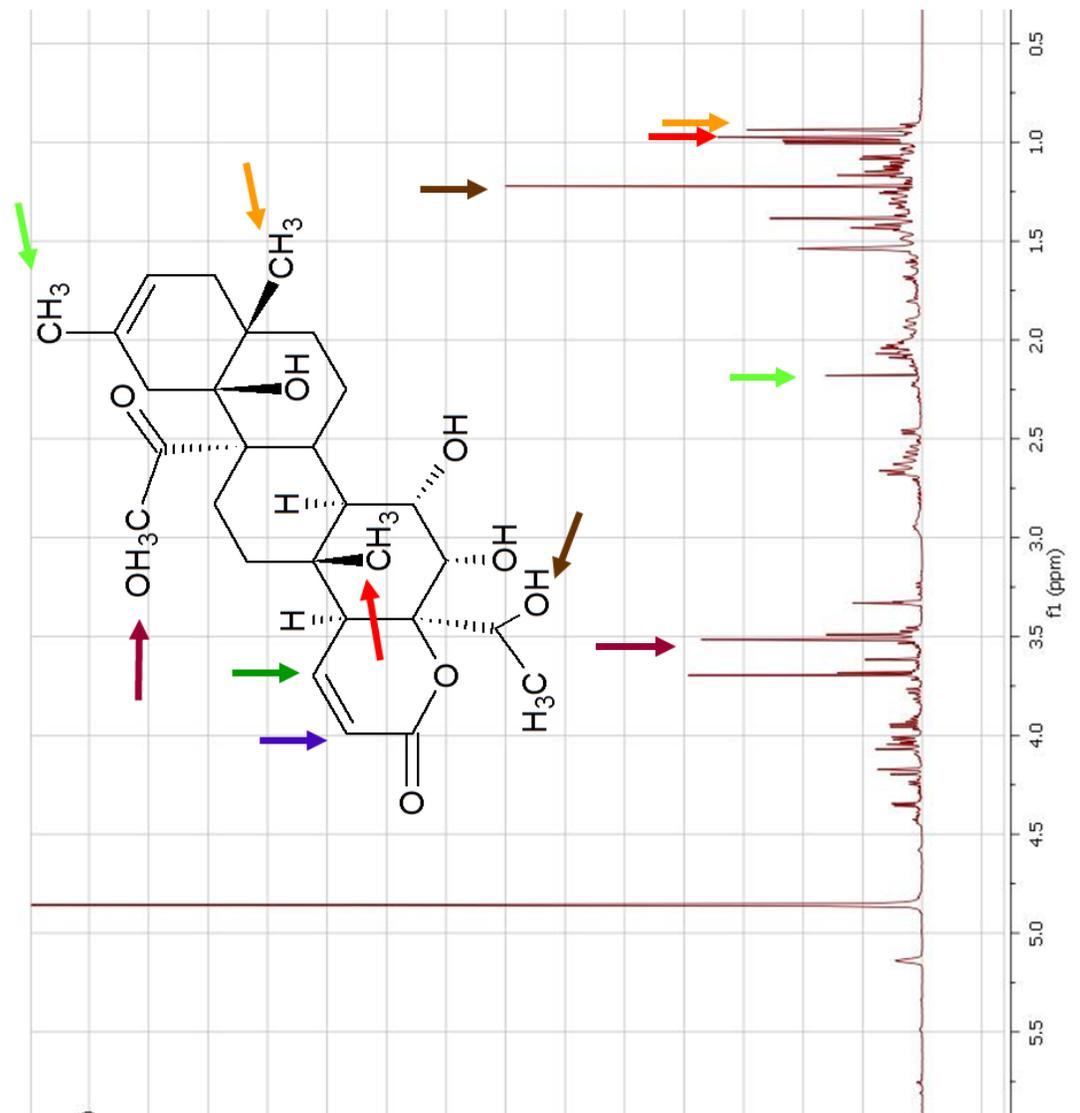


Figura 10. Espectro de ^1H RMN de una muestra de G-A.

8.3 Laberinto elevado en forma de cruz

Los ratones que recibieron diferentes dosis de G-A (1.0, 1.5, 3.25, 7.5, 15, 30 y 45 mg/kg, vo) presentaron un incremento significativo en los parámetros de porcentaje de entradas a los brazos abiertos (%EBA) y porcentaje del tiempo transcurrido en los brazos abiertos (%TBA) en el modelo LEC comparado con el grupo control ($*p < 0.05$) (Figura 11). Este efecto fue observado aún a las dosis más bajas, para la dosis de 1.0 mg/kg de G-A en el parámetro de EBA se obtuvo 36.48% y para TBA 38.25%,

mientras que para la dosis de 45 mg/kg el parámetro de EBA fue de 60.09% y TBA 63.55%. El grupo de DZP a 1.0 mg/kg indujo un gran incremento en ambos parámetros ($*p<0.05$). La dosis efectiva 50 (DE_{50}) de G-A para el parámetro %TBA fue de 0.44 mg/kg y el efecto máximo (E_{max}) fue 55.84%, mientras que para %EBA la DE_{50} fue 0.51 mg/kg con un E_{max} de 55.98%.

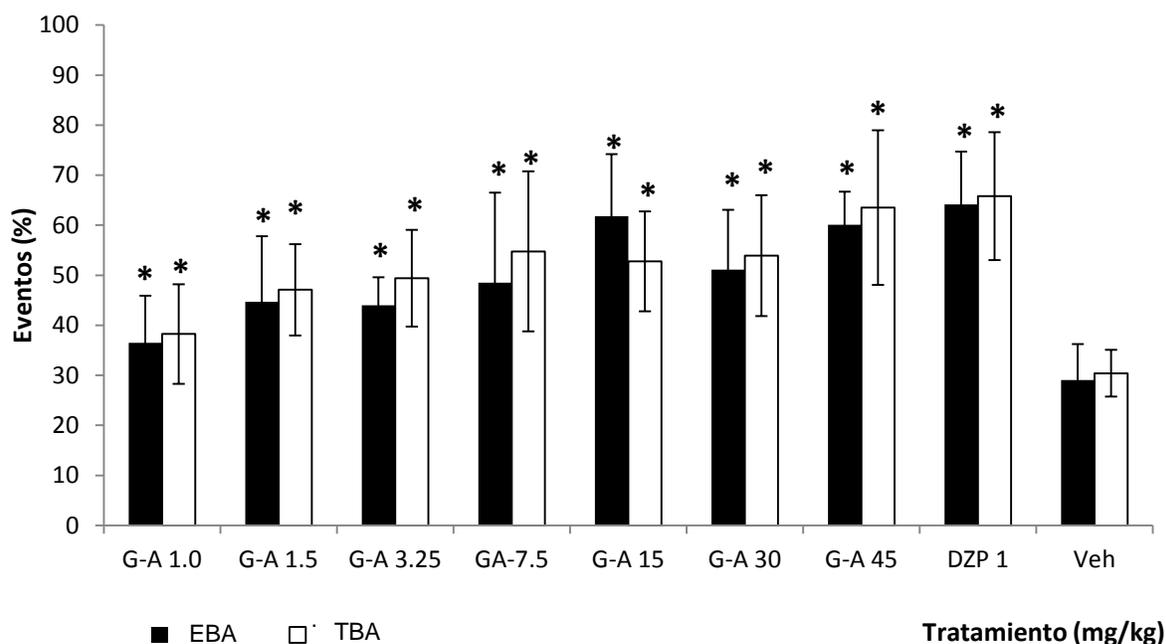


Figura 11. Efecto producido por la administración oral de diferentes dosis de Galphimina-A (G-A) sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (%EBA) y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos (%TBA) de ratones en el modelo de LEC. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) post-hoc prueba de Dunett ($n=8$; media \pm desviación estándar [DE]), $*p < 0.05$ en comparación con el vehículo [Veh]. Veh= vehículo; DZP= diacepam.

En la Figura 12, se muestran los resultados de la administración de los fármacos GABAérgicos. La administración intraperitoneal (*i.p.*) de BICC (5 mg/kg), PTX (2 mg/kg), y PTZ (10 mg/kg) indujeron una disminución significativa de los parámetros %EBA y %TBA en comparación con el vehículo (Veh) ($*p<0.05$). Esta disminución en

los parámetros muestra un comportamiento del tipo ansiogénico. DZP (1.0 mg/kg, *i.p.*) aumenta los parámetros de % EBA y % TBA en comparación con el vehículo (Veh) ($*p < 0.05$); un resultado similar se encontró en la administración de G-A (30 mg/kg, *vo*), lo cual indica que presenta un efecto ansiolítico.

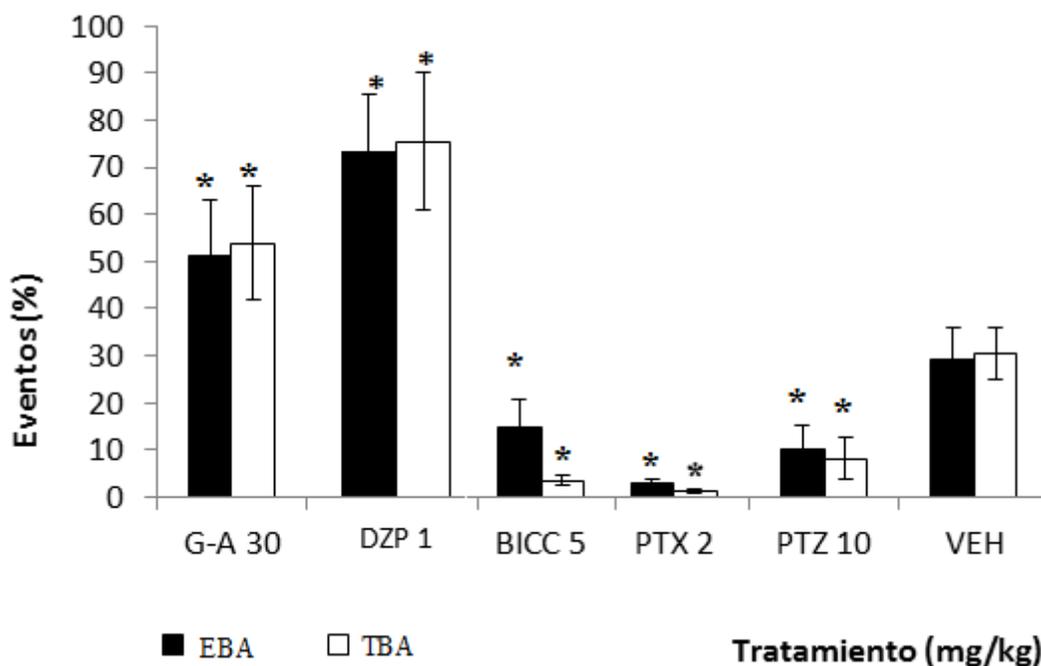


Figura 12. Efecto producido por la administración de bicuculina (BICC), picrotóxina (PTX), y pentilentetrazol (PTZ) sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (% EBA) y tiempo transcurrido en los brazos abiertos (% TBA) de ratones ICR sobre el modelo de laberinto elevado en forma de cruz (LEC). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) post-hoc prueba de Dunnett ($n=8$; media \pm desviación estándar [DE]), $*p < 0.05$ en comparación con el vehículo [Veh]).

En la Figura 13 se muestran los resultados de la co-administración de G-A (30 mg/kg) con fármacos que actúan en el sistema GABAérgico. Se puede apreciar que el efecto ansiogénico de los antagonistas GABAérgicos fue disminuido cuando se

administraron en conjunto con G-A. En los grupos que recibieron G-A y BICC o G-A y PTZ, se encontró una disminución en los parámetros %EBA y %TBA y ésta es estadísticamente diferente cuando se compara con el grupo control (* $p < 0.05$). Sin embargo, el grupo de animales que recibió G-A y PTX presentó una disminución significativa en ambos parámetros, pero sólo cuando se compararon con el grupo que recibió G-A (& $p < 0.05$, Figura13). Es notable que para los grupos tratados con G-A y BICC y G-A con PTX, hubo una diferencia significativa cuando éstos se compararon con los grupos que recibieron sólo los fármacos de síntesis (\$ $p < 0.05$). La co-administración de G-A con los fármacos ansiogénicos antagoniza este efecto de BICC y PTX.

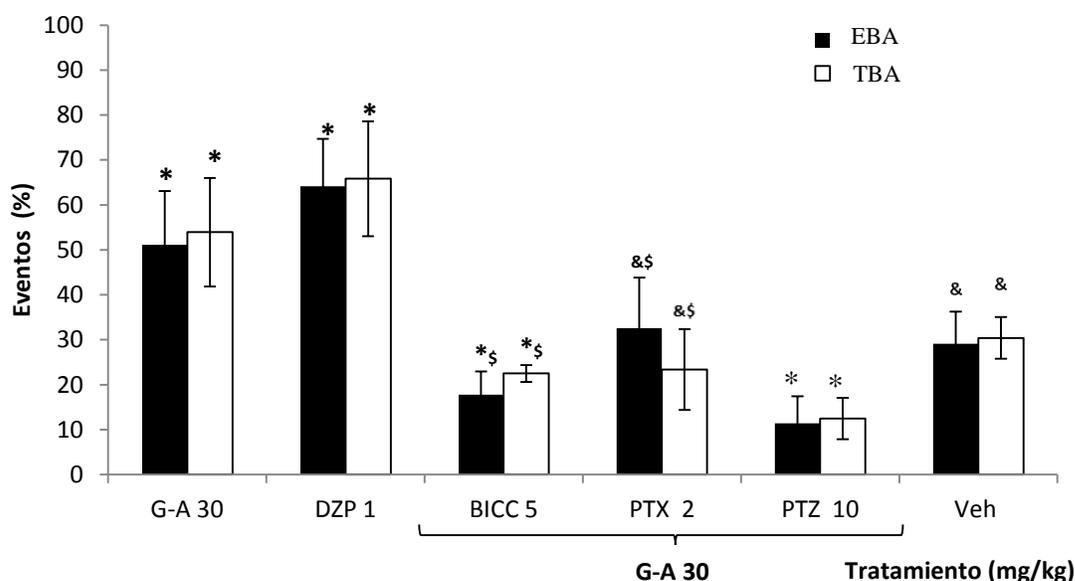


Figura 13. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Bicuculina (BICC), G-A con Picrotóxina (PTX), y G-A con Pentilentetrazol (PTZ) sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (%EBA) y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos (%TBA) en el modelo de laberinto elevado en forma de cruz (LEC). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) post-hoc prueba de Dunett ($n=8$; media \pm desviación estándar [DE]), * $p < 0.05$ en comparación con el vehículo [Veh]. & $p < 0.05$ (en comparación con el grupo de G-A

30); $^{\$}p < 0.05$ (en comparación con los grupos que recibieron sólo BICC o PTX de la Figura 12). DZP= Diacepam.

8.4 Campo abierto (CA)

Los animales tratados con DZP (1 mg/kg, *i.p.*) mostraron una disminución en el número total de cruces (CT) y estiramientos verticales (R) durante la prueba de campo abierto, un efecto que fue significativamente diferente del presentado por el grupo control negativo ($*p < 0.05$, Veh). Al analizar el efecto producido por las diferentes dosis de G-A, se observa que los CT en el CA y el número de R fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$) al grupo control negativo. Contrariamente, los antagonistas GABAérgicos PTX (2 mg/kg) y PTZ (10.0 mg/kg) fueron capaces de producir una disminución significativa ($*p > 0.05$) en estos parámetros comparados con el control negativo (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto producido por la administración de diferentes dosis de Galphimina-A (G-A) y diferentes fármacos GABAérgicos sobre el número total de cruces (CT) y el número de estiramientos verticales (R) de ratones ICR expuestos al paradigma de campo abierto.

Tratamiento (mg/kg)	Cruces totales (CT)	Estiramientos verticales (R)
Veh, 100 μ l/10 g	86.8 \pm 7.0	36.6 \pm 5.2
G-A 1.0	98.8 \pm 19.3	36.8 \pm 12.1
G-A 1.5	97.2 \pm 20.7	40.2 \pm 7.2
G-A 3.25	91.6 \pm 15.2	32.9 \pm 8.9
G-A 7.5	81.4 \pm 3.2	32.2 \pm 6.6
G-A 15	83.2 \pm 10.7	31.4 \pm 6.5
G-A 30	87.4 \pm 4.7	30.6 \pm 5.5
G-A 45	87.8 \pm 7.4	34.6 \pm 5.8
DZP 1.5	59.2 \pm 4.8*	15.6 \pm 3.3*
BICC 5.0	91.4 \pm 5.7	32.6 \pm 3.8
PTX 2.0	39.6 \pm 15.4*	16.4 \pm 8.1*
PTZ 10	60.4 \pm 12.5*	15.4 \pm 3.3*

Los valores representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). $*p < 0.05$, comparada con el Vehículo (Veh). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Dunett *posthoc*

($n=8$). G-A= Galphimina-A, DZP= Diacepam; BICC= Bicuculina; PTX= Picrotóxina; PTZ= Pentilentetrazol.

La co-administración de G-A (30 mg/kg) con el antagonista de GABA- α BICC (5 mg/kg) no causó una disminución en los parámetros de CT y R, en comparación con los grupos que solo recibieron G-A o el vehículo ($p>0.05$). Sin embargo, los resultados indican que PTX (2 mg/kg) en combinación con G-A y el grupo de ratones que recibió PTZ (10 mg/kg) en combinación con G-A disminuyeron los parámetros de CT y R, un efecto que estadísticamente fue diferente ($*p < 0.05$) del producido por la administración del Vehículo y G-A solos (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) y diferentes fármacos GABAérgicos sobre el número total de cruces (CT) y estiramientos verticales (R) en ratones ICR expuestos al paradigma de campo abierto.

Tratamiento (mg/kg)	Fármacos GABAérgicos(mg/kg)	Cruces Totales (CT)	Estiramientos verticales (R)
G-A 30		87.4 ± 4.7	30.6 ± 5.5
DZP 1		59.2 ± 4.8*	15.6 ± 3.3*
	BICC 5	82.6 ± 7.7	27.2 ± 7.7
G-A 30	PTX 2	37.6 ± 11.3*	10.4 ± 5.9*
	PTZ 10	63.0 ± 12.3*	18.4 ± 7.3*
Veh		86.8 ± 7.0	36.6 ± 5.2

Los valores representan la media ± el error estándar de la media (EEM). $*p < 0.05$, comparada con el Vehículo (Veh). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Dunett *posthoc* ($n=8$). G-A= Galphimina-A, DZP= Diacepam; BICC= Bicuculina; PTX= Picrotóxina; PTZ= Pentilentetrazol.

8.5 Registros electrofisiológicos. Registro extracelular en la ABL.

Se indujo un ligero aumento dosis-dependiente en el índice relativo de la tasa de disparo de neuronas de la ABL por la administración (*i.v.*) de dosis diferentes de G-A

(0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, and 6 mg/kg) (Figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19) con un E_{max} = 1.1432, y una DE_{50} = 0.0150 mg/kg.

Este efecto demuestra que la ABL es sensible a los efectos producidos por G-A. La cual es un área cerebral involucrada en la regulación de los estados de ánimo, con una gran concentración de neuronas glutamatérgicas, y con una presencia importante de neuronas locales inhibitorias GABAérgicas (Pape & Pare, 2010). De tal manera que, el incremento en la frecuencia de descarga inducida por G-A en la ABL puede deberse a una modulación directa o indirecta de la neurotransmisión de los mensajeros endógenos. Algunos experimentos que han evaluado la actividad electrofisiológica han mostrado que la estimulación química y eléctrica de las neuronas en esta estructura cerebral es capaz de alterar las condiciones de miedo o ansiedad.

Se ha observado ampliamente que la presencia de los estados de ansiedad se correlaciona con un incremento en la actividad neuronal de la ABL y, consecuentemente, una mayor excitabilidad de la ABL tiene una tendencia a ser ansiogénica, mientras que una excitabilidad menor de esta estructura será ansiolítica (Michael Davis, Rainnie, & Cassell, 1994). El fármaco ansiolítico diazepam, produjo una inhibición del índice relativo de la tasa de disparo en la ABL (Figura 14, ■) de manera dosis dependiente, lo cual está en relación con la actividad ansiolítica (Hodges, Green, & Glenn, 1987). El efecto producido por G-A en esta estructura fue diferente del producido por el DZP cuando se usaron dosis más

elevadas (Hodges et al., 1987). En este caso, G-A produjo un incremento ligeramente dosis dependiente de la tasa de disparo de la ABL. Cuando se co-administró G-A con DZP, el índice relativo de la tasa de disparo fue estadísticamente similar al grupo tratado solo con DZP ($p>0.05$). Al analizar los resultados se infiere que aunque ambas sustancias son capaces de ejercer un efecto ansiolítico en las pruebas de comportamiento tales como el LEC, puede haber una diferencia en el mecanismo de acción.

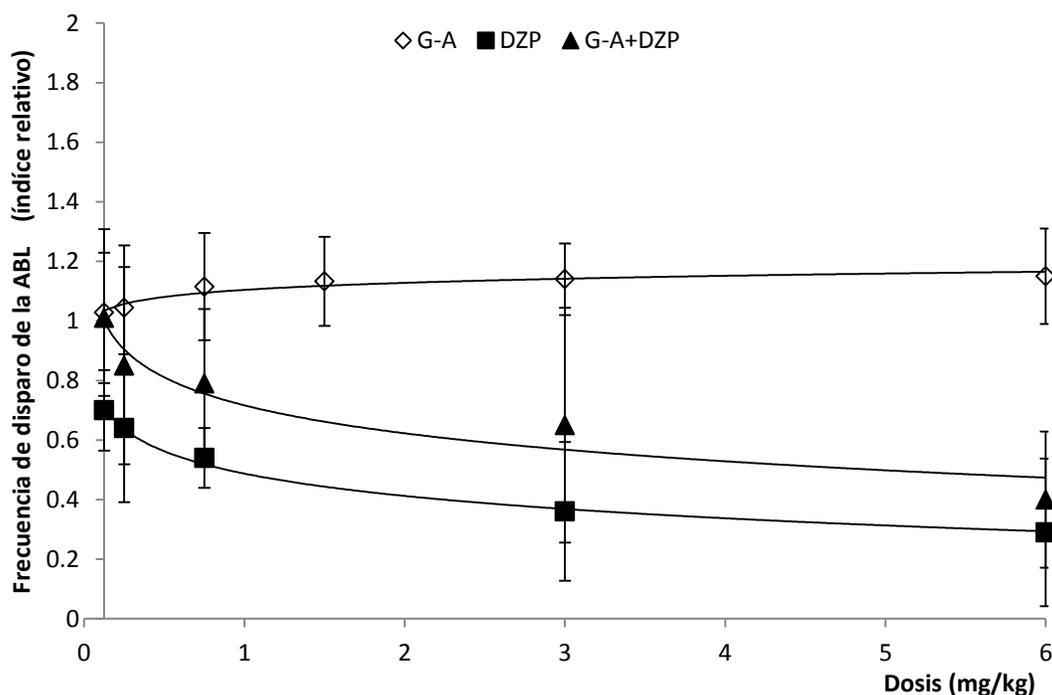


Figura 14. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Diacepam (DZP) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de DZP (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 10 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con DZP (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 10 mg/kg). Prueba *t* de Student, * $P < 0.05$.

En un intento por investigar la posible interacción con el receptor benzodiazepínico, se evaluó la combinación de G-A con Flumazenilo (FMZ). Este fármaco fue administrado en dosis crecientes, mostrando un ligero incremento en la excitabilidad neuronal de la ABL.

Aunque este efecto no fue significativamente diferente con el grupo G-A, los resultados están en concordancia con los reportes en los que sustancias que bloquean la transmisión GABAérgica inducen un efecto ansiogénico y aumentan la tasa de disparo neuronal en esta estructura (Figura 15).

Cuando se co-administró G-A con FMZ, la tasa de disparo de la curva de dosis respuesta se incrementó en comparación con el grupo tratado solo con FMZ (Figura 15), y con G-A solo. Pero, nuevamente el efecto no fue diferente entre estos grupos. Estos resultados indican que no hay interacción farmacológica entre el G-A y fármacos que modifican la neurotransmisión con el receptor de GABA-A, específicamente en el receptor de benzodiazepinas.

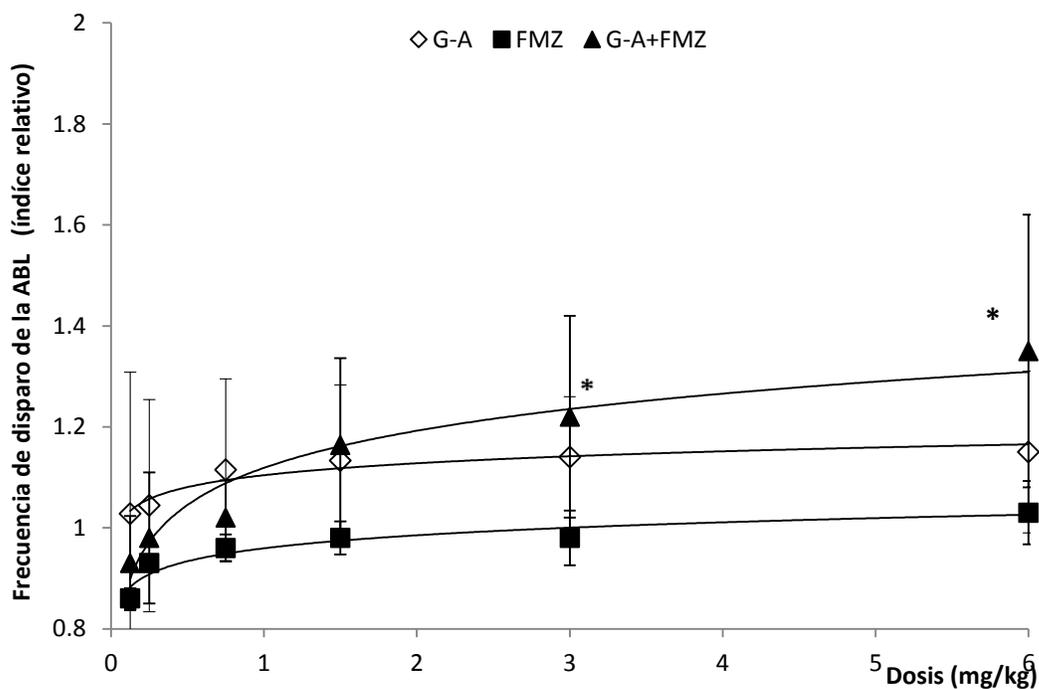


Figura 15. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Flumazenilo (FMZ) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de FMZ (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con FMZ (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, y 6 mg/kg). Prueba *t* de Student, * $P < 0.05$.

En la Figura 16 se muestra la tasa de disparo neuronal de la ABL por la administración de PTX. Se observa un incremento en la tasa de disparo, el cual no tiene diferencia estadísticamente significativa de los animales que recibieron solo G-A. De cualquier manera, la co-administración de G-A y PTX produjo un incremento significativo en la tasa de disparo, pero sólo a las dosis más altas ($p < 0.05$). Este resultado producido por G-A de modificar el efecto generado por PTX, sólo se observó en el modelo de LEC, en el cual la combinación de G-A y PTX fue capaz de incrementar significativamente el %TBA y %EBA.

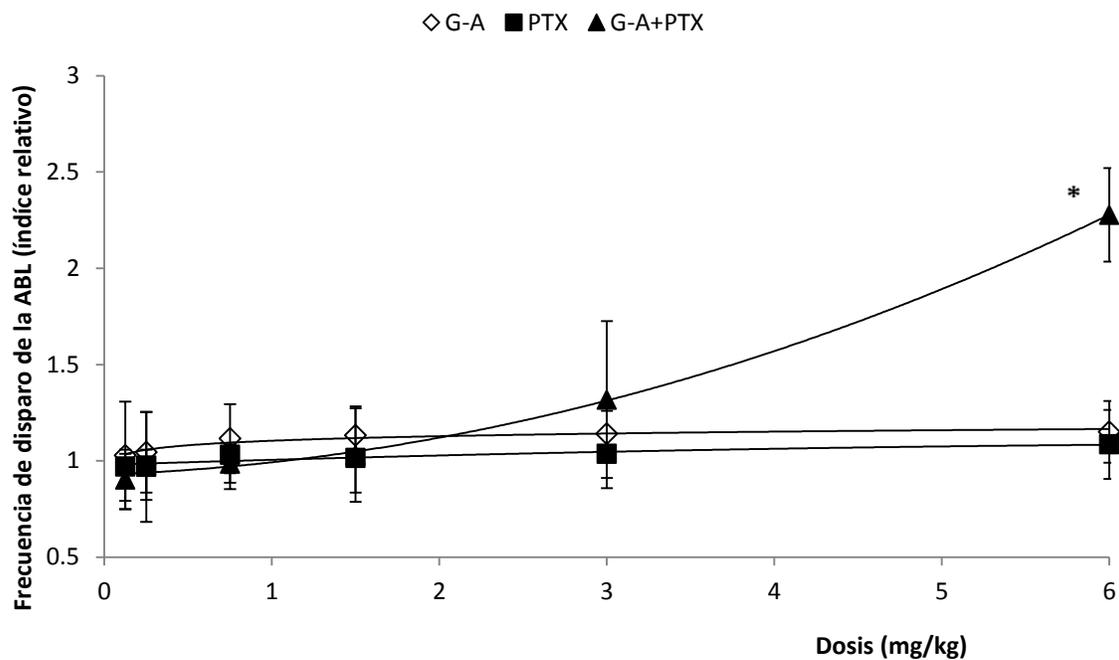


Figura 16. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con picrotoxina (PTX) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de PTX (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con PTX (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Prueba t de Student. * $P < 0.05$.

En la Figura 17 se ilustra que la administración de dosis crecientes de PTZ no modifica la frecuencia del disparo neuronal y aunque la co-administración de G-A con PTZ provocó una disminución de la frecuencia de disparo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

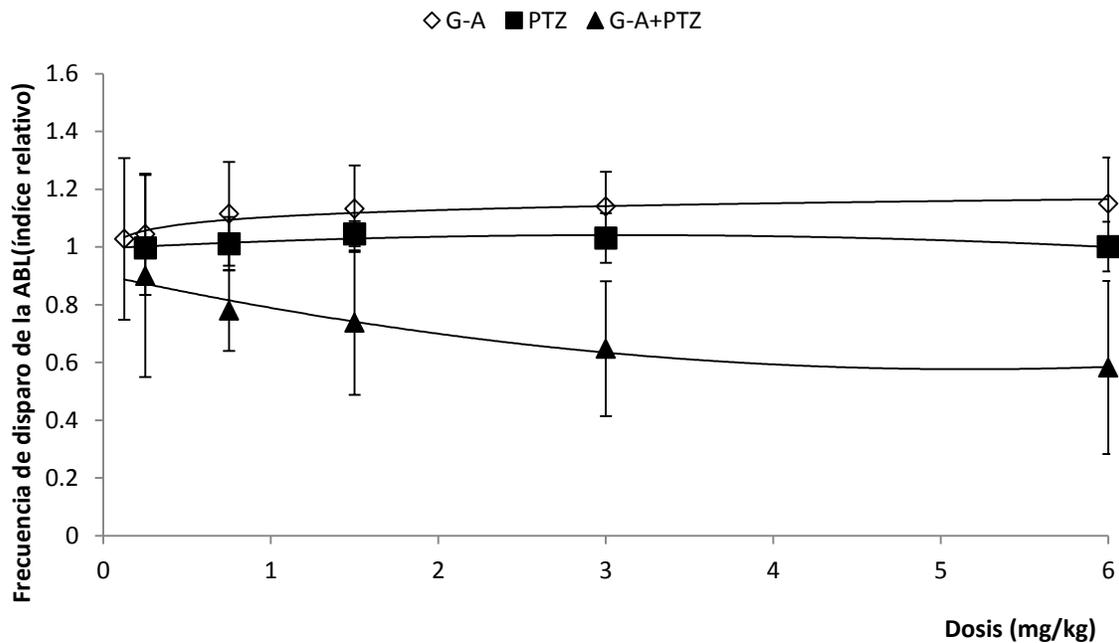


Figura 17. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con pentilenetrazol (PTZ) sobre el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de PTZ (0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con PTZ (0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15 mg/kg). Prueba t de Student. * $P < 0.05$.

En la Figura 18 se muestra que BICC no modifica la frecuencia de disparo neuronal, en tanto que la co-administración de G-A + BICC incrementa significativamente este parámetro en una manera dosis dependiente. Por otra parte, estos valores de las curvas también fueron más elevados que aquellos del efecto de G-A cuando se administró solo ($p < 0.005$).

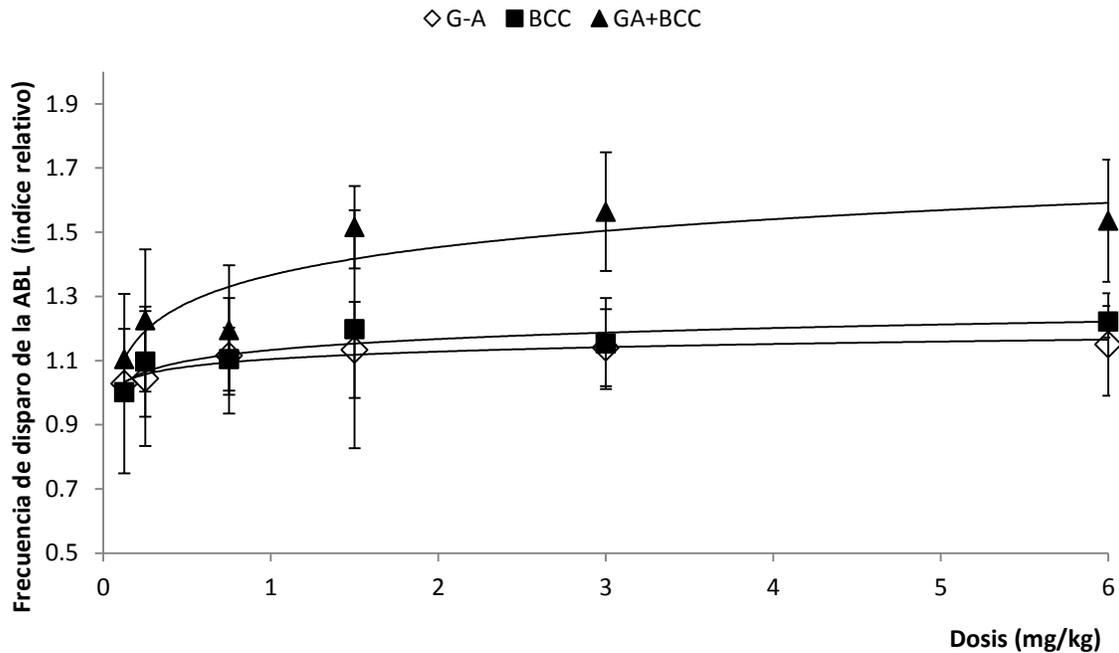


Figura 18. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con bicuculina (BICC) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de BICC (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con BICC (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Prueba t de Student. * $p < 0.05$.

El faclofén indujo un incremento significativo de la tasa de disparo en la ABL de una manera dosis dependiente. Este efecto puede ser considerado similar al que se produjo por G-A, pero cuando ambas sustancias se co-administraron (G-A yFCF), se produjo una disminución consistente y dosis dependiente de la tasa de disparo (Figura 19).

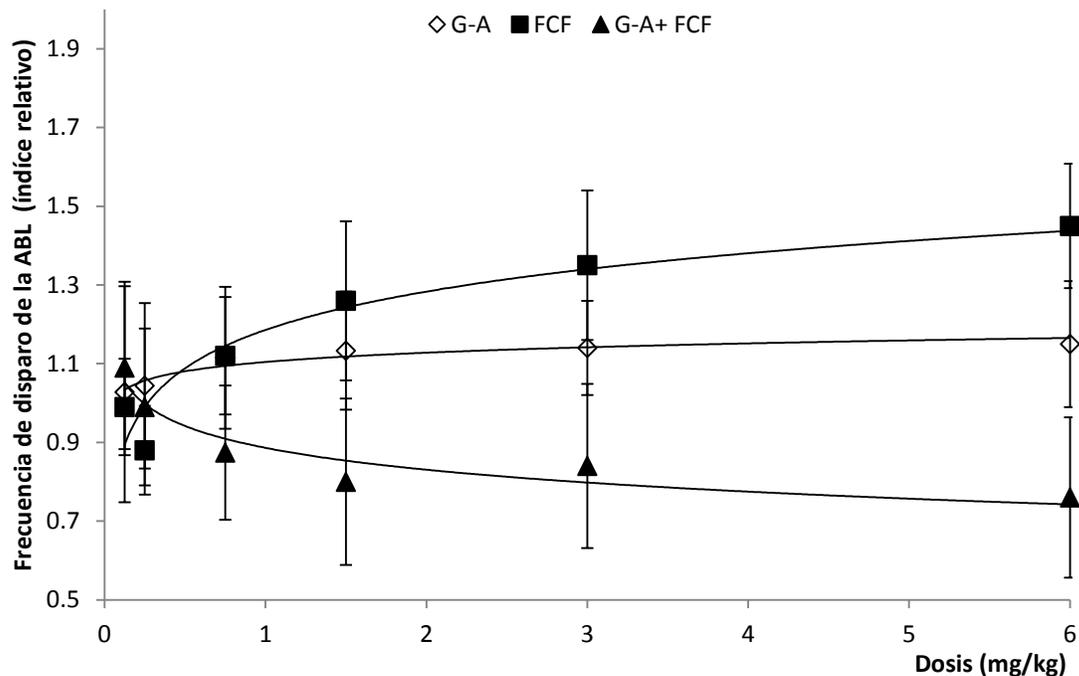


Figura 19. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con faclofén (FCF) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de FCF (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con PHC (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Prueba t de Student. * $p < 0.05$.

Los datos presentados sugieren que el efecto producido por G-A en neuronas de la ABL es diferente del que presenta el DZP, y no interacciona directamente con el sistema GABAérgico. La posible interacción entre G-A y PTX, que se observó en el presente trabajo, probablemente no involucra el sistema GABAérgico. Se conoce bien que la PTX también es capaz de inhibir el influjo del ion cloruro en receptores de glicina; también como por bloquear receptores que son selectivos de cationes, tal como el 5-HT_{3A} (Das, Bell-Horner, Machu, & Dillon, 2003). La PTX también es capaz de antagonizar el efecto excitador de DOI (un agonista del receptor 5-HT_{2A/2C}) en la ABL (Sun et al., 2013) en la cual, la activación produce un efecto ansiolítico. Con

estos hechos, y debido a la similitud estructural entre G-A y G-B (el otro triterpeno ansiolítico aislado de *G. glauca*, que ha mostrado una interacción con el sistema serotoninérgico en el hipocampo), es posible sugerir que la actividad ansiolítica *in vivo* de G-A puede involucrar la interacción con otro sistema de neurotransmisión tal como el serotoninérgico.

El MPEP indujo un incremento de la tasa de disparo en la ABL de una manera dosis dependiente. Este efecto es estadísticamente similar al presentado por G-A, pero cuando se co-administraron ambas sustancias (G-A y MPEP), se produjo un incremento dosis-dependiente en la tasa de disparo de la ABL, aunque este efecto no tiene diferencia significativa con respecto a G-A (Figura 20).

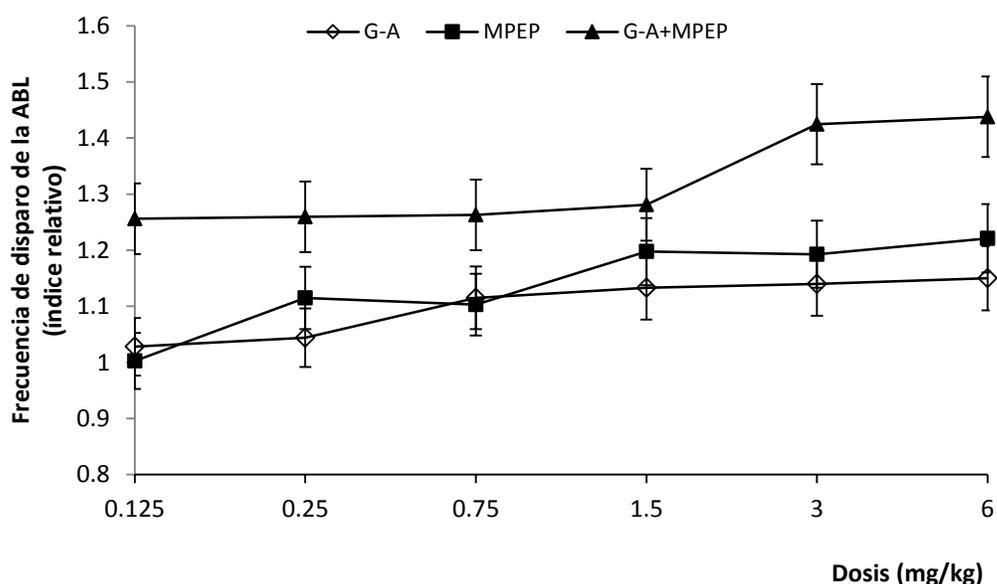


Figura 20. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con 2-metil-6-(feniletinil)piridina (MPEP) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de

MPEP (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con MPEP (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Prueba t de Student. * $p < 0.05$.

La administración *i.v.* de NMDA indujo un ligero aumento en la frecuencia de descarga de la ABL, éste efecto fue estadísticamente similar al presentado por el grupo que recibió G-A. Cuando se co-administran las dos sustancias (GA y NMDA) hay un ligero aumento dosis-dependiente de la frecuencia de disparo en la ABL, sin embargo estos resultados no son estadísticamente diferentes del grupo que sólo recibe G-A (Figura 21)

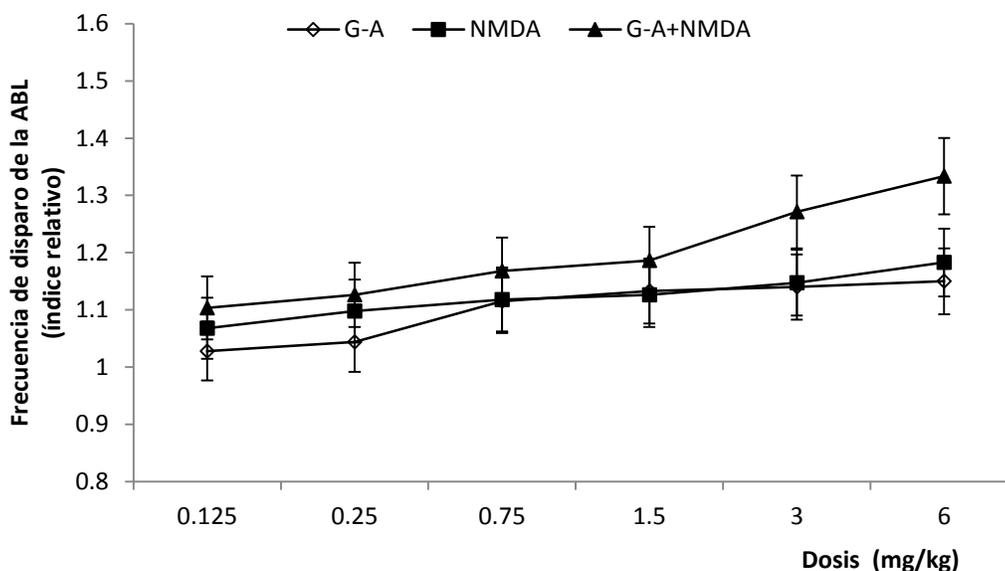


Figura 21. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL. ■Dosis acumulativas de NMDA (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con NMDA (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Prueba t de Student. * $p < 0.05$.

La administración de dizolcipina (MK-801) disminuyó de manera dosis-dependiente la frecuencia de descarga de la amígdala basolateral, sin embargo, no fue estadísticamente diferente al del grupo que solo recibió G-A el cual incrementa

ligeramente de manera dosis-dependiente la frecuencia de descarga de la ABL. Cuando se co-administran ambas sustancias (G-A y MK-801) hay una reversión del efecto inhibitor de MK-801 sobre la frecuencia de disparo de la ABL, este comportamiento fue estadísticamente similar al grupo que solo recibió G-A (Figura 22).

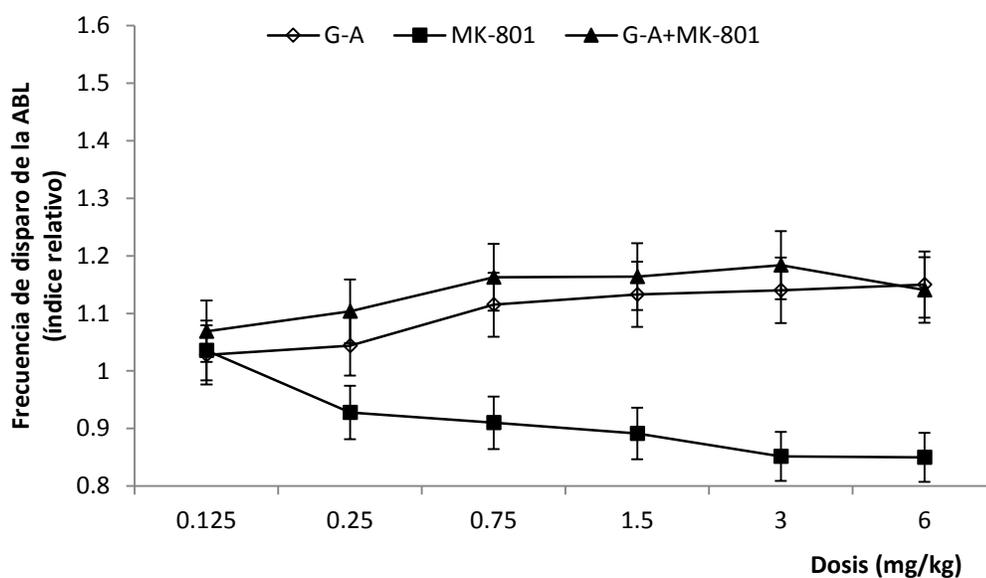


Figura 22. Efecto producido por la co-administración de Galphimina-A (G-A) con Dizolcipina (MK-801) bajo el índice relativizado de descarga de la ABL. ■ Dosis acumulativas de MK-801 (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). ▲ Co-administración de G-A (0.125 mg/kg) con MK-801 (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Prueba t de Student. * $p < 0.05$.

9. Discusión

Se ha reportado que G-A es uno de los triterpenos característicos obtenidos de la especie vegetal *Galphimia glaucay* se ha demostrado (en modelos farmacológicos *in vivo*) que ejerce un efecto ansiolítico cuando se administra (15 mg/kg, *i.p.*) en ratones (M. Herrera-Ruiz, M. González-Cortazar, et al., 2006). En el presente trabajo, el efecto farmacológico de este compuesto fue corroborado, pero en este caso, se utilizó la vía oral para su administración. Esto permite la afirmación de que esta sustancia altamente liposoluble, actúa directamente sobre el SNC (Abarca et al., 2014). Es importante destacar que existen reportes de otros compuestos naturales aislados de plantas medicinales, tales como los flavonoides (quercetina y canferol), los cuales ejercen un efecto ansiolítico sólo cuando se administran oralmente a los ratones, pero cuando se emplea la vía intraperitoneal el efecto no se observa. De tal manera que se propone que estos compuestos actúan como pro-fármacos (Vissienon, Nieber, Kelber, & Butterweck, 2012). En este caso la respuesta de los ratones a la vía oral fue similar a la producida cuando se administra *i.p.*, lo cual fue reportado por Herrera-Ruiz, et al., 2006, en dicho trabajo se indicó que la administración *i.p.* de G-A a una dosis de 15 mg/kg causó un incremento significativo en los parámetros de EBA (48%) y TBA (53%); en el presente trabajo, la administración oral indujo un incremento en EBA de 61% y TBA de 52%. Se puede apreciar que el tiempo transcurrido en los brazos abiertos (TBA) ha sido prácticamente el mismo; este parámetro es el principal en la validación del LEC, en términos de considerar una sustancia como un ansiolítico. Durante la evaluación, también se observó que el efecto en los parámetros de EBA y TBA producido por G-

A no mostró un comportamiento dosis-dependiente, al menos dentro del rango de administración (1.0 – 45 mg/kg). Por lo que el margen de actividad de G-A sobre la ansiedad analizada en ratones con el modelo de LEC es amplia y que este rango de acción no induce un efecto sedante, tal como el que inducen las benzodiazepinas, las cuales en rangos de dosis reducidas, producen un efecto ansiolítico, sedante e hipnótico. Las benzodiazepinas son empleadas experimentalmente para validar procedimientos que permiten la evaluación de nuevos fármacos con potencial efecto ansiolítico, tales como el modelo de LEC. Este modelo etológico ha demostrado su sensibilidad en la exploración de fármacos ansiolíticos así como de ansiogénicos (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985), cuyos mecanismos de acción emplean receptores benzodiazepínicos; el modelo de LEC también es sensible a sustancias que poseen un mecanismo de acción no benzodiazepínico (Pellow & File, 1986). El DZP ejerce diferentes efectos biológicos, los cuales son dosis-dependientes con un rango desde la ansiolisis, sedación hasta la hipnosis (Bousoño, Arango, Bascarón, & Bobes, 2009). El DZP a una dosis de 1.0 mg/kg administrado *i.p.* produce un incremento en el número de EBA y TBA en el modelo de LEC, resultados que han sido ampliamente documentados en la literatura para este fármaco.

Con la finalidad de evaluar si G-A es capaz de disminuir la ansiedad generada por fármacos antagonistas del receptor GABA-A, se decidió medir los resultados conductuales de los ratones que recibieron una dosis de 30 mg/kg de G-A co-administrada con estas sustancias. Primero se evaluó el efecto de BICC (5 mg/kg),

un antagonista competitivo, PTX (2.0 mg/kg), un antagonista no competitivo, y PTZ (10 mg/kg), un producto con un mecanismo de acción que no está completamente bien entendido pero que representa una herramienta útil debido a que induce efectos en el SNC por modular el receptor GABA-A, efectos tales como proconvulsivante y a dosis pequeñas, un ansiogénico. Todos estos compuestos, de forma individual causaron una disminución en los parámetros de EBA y TBA en ratones sometidos al modelo de LEC. Existen datos en la literatura que indican que PTX (0.03-0.5 mg/kg) y BICC (1-8 mg/kg) no posee un efecto ansiogénico en el modelo de LEC cuando se administra intraperitonealmente (Clénet, Hascoët, Fillion, Galons, & Bourin, 2005); es probable, al menos para el caso de PTX, que la ausencia del efecto que estos autores reportan se debía a bajas dosis en comparación con la que se empleó en el presente trabajo (2 mg/kg). La co-administración de una dosis oral de 30 mg/kg de G-A con BICC (5.0 mg/kg, *i.p.*) y la co-administración de G-A con PTX (2.0 mg/kg, *i.p.*) no causó una disminución del efecto ansiogénico de estos fármacos, porque los parámetros de EBA y TBA fueron significativamente mayores que en ratones que recibieron sólo BICC y PTX. Este efecto no fue observado con el grupo que recibió la co-administración de G-A y PTZ.

Se ha demostrado que fármacos GABAérgicos, tales como las benzodiazepinas, ejercen su efecto depresor sobre el SNC en una manera dosis-dependiente, y que la activación de este sistema aumenta los efectos de depresión del sistema nervioso tales como ansiolisis, sedación, hipnosis y muerte. El DZP ejerce un efecto ansiolítico pero también un efecto sedante, considerando éste como uno de sus efectos

secundarios no deseables y uno que justifica su uso principalmente en la noche. Experimentalmente, se han descrito el efecto ansiolítico de DZP a diferentes dosis *i.p.*, así como su efecto sobre la actividad motora y ambas acciones están relacionadas de acuerdo al incremento de la dosis en los ratones (por ejemplo, 2.5 y 10 mg/kg). Las benzodiazepinas también ejercen un efecto ansiolítico, medido como un incremento en el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el modelo de LEC, y el efecto sedante, observado como una disminución en la locomoción en el modelo de CA (A Klodzinska et al., 2004; Pellow & File, 1986). En otro reporte, la administración de dosis de 0.05, 0.2, 0.8, y 1.5 mg/kg *i.p.* de DZP a ratas Wistar causó una disminución en la actividad motora en el CA (Siemiątkowski, Sienkiewicz-Jarosz, Członkowska, Bidziński, & Płaźnik, 2000). De acuerdo con estos datos, en el presente trabajo de investigación, se observó que una dosis de 1.0 mg/kg de DZP causó un efecto ansiolítico acompañado por una disminución en la actividad motora espontánea en el modelo de CA, lo cual es manifestado como un parámetro de sedación (Aitkenhead Alan R., Rowbotham David J., & Graham, 2001). En esta prueba los animales fueron colocados en un ambiente novedoso, y se midieron los parámetros de locomoción, número de estiramientos verticales (R), número de acicalamientos (G), entre otros, lo cual sirvió para determinar los efectos secundarios o no específicos de los fármacos que mostraron un efecto ansiolítico en el LEC (Choleris, Thomas, Kavaliers, & Prato, 2001). En contraste con DZP, la administración de cualquier dosis de G-A no indujo cambios en la actividad locomotora y tampoco en el número de estiramientos verticales, indicando, al menos en las dosis evaluadas, este triterpeno no causa el

efecto secundario de sedación observado con las benzodiazepinas. Entre los fármacos GABAérgicos PTX y PTZ causaron una disminución de la actividad motora en el modelo de CA, un efecto que ha sido observado en anteriores investigaciones; por ejemplo, la administración de dosis subcutáneas de 0.6 y 1.0 mg/kg de PTX a ratones albinos suizos indujo una disminución en los parámetros de locomoción en esta evaluación (Stankevicius, Rodrigues-Costa, Camilo Flório, & Palermo-Neto, 2008).

Cuando la dosis de 30 mg/kg de G-A fue administrada junto con los antagonistas GABAérgicos, sólo los ratones que recibieron G-A con PTX no exhibieron una modificación del efecto del antagonista sobre la actividad locomotora en el modelo de CA, lo cual puede sugerir la selectividad de los efectos de G-A para contrarrestar la acción de los fármacos antagonistas. Es importante recordar que ambas sustancias (BICC y PTX) actúan generando la misma respuesta pero con un mecanismo diferente; la primera es un antagonista competitivo de GABA, mientras que PTX inhibe el flujo del ion cloruro por bloquear el canal iónico a través de la membrana citoplasmática.

Por otro lado, se puede pensar que G-A actúa por un mecanismo diferente del GABAérgico; en cuanto a esto, se ha demostrado que otra Galphimina ansiolítica, G-B, produce un efecto selectivo sobre el SNC, particularmente en el hipocampo dorsal de la rata, en el cual es capaz de modificar la frecuencia de disparo espontánea en registros de la actividad eléctrica de la región CA1 del hipocampo. Esta zona cerebral

tiene una gran influencia sobre los desórdenes de ansiedad. En ese estudio, se mostró que G-B interactúa en una manera compleja con fármacos serotoninérgicos sobre el hipocampo de la rata (Jiménez-Ferrer, Herrera-Ruiz, Ramírez-García, Herrera-Arellano, & Tortoriello, 2011). Estos datos, junto los resultados del presente trabajo, dirigen a pensar que triterpenos característicos de *Galphimia glauca*, producen acciones complejas en el SNC para causar su efecto ansiolítico.

Se indujo un ligero incremento dosis-dependiente sobre el índice relativo de la tasa de disparo de neuronas de la ABL por la administración (*i.v.*) de diferentes dosis de G-A (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, and 6 mg/kg) con un E_{max} = 1.1432 y una DE_{50} = 0.0150 mg/kg. Este efecto demuestra que la ABL es sensible a los efectos producidos por G-A, la cual es un área cerebral involucrada en la regulación del estado de ánimo, con una gran concentración de neuronas glutamatérgicas y con una importante presencia de neuronas inhibitorias GABAérgicas (Pape & Pare, 2010). De tal manera que el incremento en la frecuencia de disparo inducida por G-A puede ser debido a la modulación directa o indirecta de la neurotransmisión de los mensajeros endógenos. Algunos experimentos que evalúan la actividad electrofisiológica han mostrado que la estimulación química y eléctrica de las neuronas en esta estructura cerebral es capaz de alterar situaciones de miedo o ansiedad. Se ha observado ampliamente que la presencia de los estados de ansiedad se correlaciona con un incremento en la actividad neuronal en la ABL y consecuentemente, mayor excitabilidad en la ABL tiene una tendencia a desarrollar estados de ansiedad, mientras que una excitabilidad baja de esta estructura puede producir un estado

ansiolítico (Michael Davis et al., 1994). El fármaco ansiolítico DZP, produjo una inhibición del índice relativo de la tasa de disparo de la ABL de manera dosis-dependiente, lo cual concuerda con la actividad ansiolítica (Hodges et al., 1987). Cuando G-A fue co-administrada con DZP, el índice relativo de la tasa de disparo fue estadísticamente similar al del grupo tratado sólo con DZP. Éstos resultados indican que aunque ambas sustancias son capaces de ejercer un efecto ansiolítico en el modelo conductual de laberinto elevado en forma de cruz, tienen un mecanismo de acción diferente.

En un intento por investigar una posible interacción con el receptor a las benzodiazepinas, se evaluó la co-administración de G-A con FMZ, la tasa de disparo de la curva dosis-respuesta se incrementó respecto del grupo tratado sólo con FMZ pero no hubo diferencia estadística significativa, lo cual indica que no hay interacción farmacológica entre G-A y los fármacos que modifican la neurotransmisión con el GABA_AR, específicamente sobre el receptor de las benzodiazepinas. Cuando se coadministra G-A con PTX hay un incremento en la frecuencia de disparo de la ABL respecto de la administración del PTX sola pero sólo a las dosis más altas, consistente con este resultado G-A modifica el efecto producido por PTX en el LEC aumentando el %EBA y el %TBA, esta posible interacción probablemente no involucra el sistema GABAérgico. Es bien conocido que PTX también es capaz de inhibir el influjo de Cl⁻ en los receptores de glicina, también como por bloquear receptores que son selectivos a cationes, tal como el caso del receptor 5-HT_{3A} (Das et al., 2003). La PTX es también capaz de antagonizar el efecto excitatorio de DOI

(un agonista del receptor 5-HT_{2A/2C}) en la ABL (Sun et al., 2013), en el cual la activación produce un efecto ansiolítico. Con estos hechos y debido a la similitud estructural entre G-A y G-B (el otro triterpeno ansiolítico aislado de *G. glauca*, que ha mostrado una interacción con el sistema serotoninérgico en el hipocampo), es posible sugerir que la actividad ansiolítica *in vivo* de G-A puede involucrar la interacción con el sistema serotoninérgico.

La administración de MPEP un antagonista de los mGluR5 indujo un aumento en la frecuencia de descarga de la ABL de manera dosis dependiente, este efecto es estadísticamente similar al mostrado por G-A cuando se administra solo y se ve aumentada la tasa de disparo cuando se co-administran juntas las dos sustancias, de manera dosis dependiente. Se tiene reportado que ambas sustancias producen un efecto ansiolítico en modelos conductuales, se cree que el efecto ansiolítico de MPEP se lleva a cabo por el bloqueo de los receptores mGluR5 localizados en las neuronas glutamatérgicas de la ABL que se proyectan y activan el núcleo central de la amígdala y esto dirige a una inhibición mediada por las neuronas GABAérgicas de las islas intercaladas mediales localizadas lateralmente (De La Mora et al., 2006).

La activación del receptor inotrópico de glutamato del tipo NMDA induce una mayor excitabilidad en el sistema nervioso debido a que está acoplado a un canal iónico que favorece el flujo no selectivo de los iones Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (Purves et al., 2004). La administración de G-A así como la administración de NMDA mostraron un aumento en la frecuencia de descarga de la amígdala basolateral, cuando se co-administraron

ambas sustancias el efecto no fue estadísticamente diferente de la administración de G-A. Lo cual nos indica que estas dos sustancias no tienen interacción entre sí. La administración del MK-801, un antagonista no competitivo del receptor a NMDA disminuye la frecuencia de disparo de la ABL debido a que bloquea el flujo de los diferentes iones a través del canal (Huettner & Bean, 1988), este efecto no es estadísticamente diferente del presentado por la administración de G-A. G-A revierte la inhibición en la frecuencia de disparo en la ABL del MK-801 cuando estas sustancias son co-administradas, sin embargo el resultado no es estadísticamente significativo, lo cual evidencia que G-A no interacciona con esta sustancia.

10. Conclusiones

- Se evidenció que Galphimina-A posee un efecto ansiolítico dosis-dependiente (1.0 – 45 mg/kg, vo) en el modelo de laberinto elevado en forma de cruz, el cual no produce un efecto sedante asociado.
- G-A es capaz de contrarrestar la ansiedad producida por la administración de antagonistas de GABA_AR en el modelo de LEC.
- G-A no interactúa con PTZ y BICC en el modelo de laberinto elevado en forma de cruz pero si lo hace con PTX.
- Los resultados obtenidos de los registros electrofisiológicos evidencian que el efecto producido por G-A es diferente del DZP y sugieren que G-A no interactúa directamente con el sistema GABAérgico, mientras que G-A fue capaz de

modificar el efecto producido por PTX, BCC y FCF evidenciando un mecanismo de acción diferente.

- G-A no interactúa directamente con los fármacos glutamatérgicos MPEP, NMDA, MK-801 en la ABL.

11. Perspectivas

- Evaluar la interacción de Galphimina-A con el sistema serotoninérgico de la amígdala basolateral y otras estructuras relacionadas con los trastornos de ansiedad.
- Determinar el efecto tóxico y genotóxico de Galphimina-A por una administración crónica en roedores.
- Evaluar el efecto ansiolítico de un extracto estandarizado en la concentración de Galphimina-A.

12. Referencias bibliográficas

- Abarca, R., Zamilpa, A., Alarcón, F., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., & Jiménez-Ferrer, E. (2014). Pharmacokinetic Study in Mice of Galphimine-A, an Anxiolytic Compound from *Galphimia glauca*. *Molecules*, *19*(3), 3120.
- Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Jiménez, J. E., Alonso-Cortés, D., . . . Tortoriello, J. (2007). Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, *109*(1), 35-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.013>
- Aitkenhead Alan R., Rowbotham David J., & Graham, S. (2001). Sedative and anticonvulsant drugs. In R. D. J. Aitkenhead Alan R., Smith Graham (Ed.), *Textbook of Anaesthesia* (Fourth ed., pp. 192-200). New York: Churchill Livingstone.
- Alt, A., Weis, B., Ogden, A., Li, X., Gleason SD., Calligaro, D., . . . Witkin, J. (2006). In vitro and in vivo studies in rats with LY293558 suggest AMPA/kainite receptor blockade as a novel potencial mechanism for the therapeutic treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacology*, *185*, 240-247.
- Alt, A., Weiss, B., Ornstein, P. L., Gleason, S. D., Bleakman, D., Stratford Jr, R. E., & Witkin, J. M. (2007). Anxiolytic-like effects through a GLUK5 kainate receptor mechanism. *Neuropharmacology*, *52*(7), 1482-1487. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.02.005>
- Amiel, J., & Mathew, S. (2007). Glutamate and anxiety disorders. *Current Psychiatry Reports*, *9*(4), 278-283. doi: 10.1007/s11920-007-0033-7
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*, *21*(2), 205-235. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80065-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80065-X)
- Ashton, H., & Young, A. H. (2003). GABA-Ergic Drugs: Exit Stage Left, Enter Stage Right. *Journal of Psychopharmacology*, *17*(2), 174-178. doi: 10.1177/0269881103017002004
- Baldessarini, R. (1991). Drugs and the treatment of psychiatric disorders In A. Goodman, T. Rall, A. Nies & P. Taylor (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics* (8 ed., Vol. 1, pp. 423-429.). Singapore: Ed. McGraw-Hill, Inc. .
- Bergink, V., van Megen and, H. J. G. M., & Westenberg, H. G. M. (2004). Glutamate and anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, *14*(3), 175-183. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X\(03\)00100-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X(03)00100-7)
- Bertoglio, L., & Carobrez, A. (2003). Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharmacology*, *170*(4), 335-342. doi: 10.1007/s00213-003-1558-z
- Besheer, J., & Hodge, C. W. (2004). Pharmacological and Anatomical Evidence for an Interaction Between mGluR5- and GABAA [alpha]1-Containing Receptors in the Discriminative Stimulus Effects of Ethanol. *Neuropsychopharmacology*, *30*(4), 747-757.

- Blanco, C., Antia, S. X., & Liebowitz, M. R. (2002). Pharmacotherapy of social anxiety disorder. *Biological Psychiatry*, *51*(1), 109-120. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01294-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01294-X)
- Bourin, M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective *Dialogues in clinical neuroscience*, *17*(3), 295-303.
- Bousoño, M., Arango, C., Bascarón, M. T., & Bobes, J. (2009). Fármacos ansiolíticos e hipnóticos. In P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J. C. Leza, M. A. Moro & A. Portolés (Eds.), *Farmacología Básica y Clínica* (18 ed., pp. 275-290). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S. A.
- Cannistraro, P., & Rauch, S. (2003). Neural circuitry of anxiety: evidence from structural and functional neuroimaging studies. *Psychopharmacology bulletin*, *37* (4), 8-25.
- Cavallini, M., & Bellodi, L. (2001). Genetics of anxiety disorders. In E. Griez, C. Faravelli, D. Nutt & J. Zohar (Eds.), *Anxiety Disorders. An introduction to clinical management and research* (pp. 41-50): Ed. John Wiley & Sons Ltd.
- Clénet, F., Hascoët, M., Fillion, G., Galons, H., & Bourin, M. (2005). Role of GABA-ergic and serotonergic systems in the anxiolytic-like mechanism of action of a 5-HT-moduline antagonist in the mouse elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, *158*(2), 339-348. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2004.09.015>
- Coyle, J., Leski, M., & Morrison, J. (2002). The diverse roles of l-glutamic acid in brain signal transduction. In L. Kenneth, D. Charney, J. Coyle & C. Nemeroff (Eds.), *Neuro Psychopharmacology. The Fifth Generation of Progress* (pp. 71-90). Chichester, United Kingdom: Ed. Williams and Wilkins Publishers.
- Cryan, J. F., & Kaupmann, K. (2005). Don't worry 'B' happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, *26*(1), 36-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2004.11.004>
- Charney, D. S. (2003). Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *108*, 38-50. doi: 10.1034/j.1600-0447.108.s417.3.x
- Chojnacka-Wójcik, E., Kłodzinska, A., & Pilc, A. (2001). Glutamate receptor ligands as anxiolytics. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, *2*(8), 1112-1119.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *25*(3), 235-260. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2)
- Das, P., Bell-Horner, C. L., Machu, T. K., & Dillon, G. H. (2003). The GABAA receptor antagonist picrotoxin inhibits 5-hydroxytryptamine type 3A receptors. *Neuropharmacology*, *44*(4), 431-438. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00032-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00032-7)
- Davidson, J. (2004). Use of benzodiazepines in social anxiety disorder, generalized anxiety disorder, and posttraumatic stress disorder *Journal of Clinical Psychiatry*, *65*(5), 29-33.
- Davis, M. (1992). The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, *15*, 353-375.

- Davis, M., Rainnie, D., & Cassell, M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 17(5), 208-214. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90106-6](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(94)90106-6)
- De La Mora, M. P., Lara-García, D., Jacobsen, K. X., Vázquez-García, M., Crespo-Ramírez, M., Flores-Gracia, C., . . . Fuxe, K. (2006). Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. *European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2749-2759. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04798.x
- Drake, R. G., Davis, L. L., Cates, M. E., Jewell, M. E., Ambrose, S. M., & Lowe, J. S. (2003). Baclofen Treatment for Chronic Posttraumatic Stress Disorder. *Annals of Pharmacotherapy*, 37(9), 1177-1181. doi: 10.1345/aph.1C465
- Dravolina, O., Danysz, W., & Besspalov, A. (2006). Effects of group I metabotropic glutamate receptor antagonists on the behavioral sensitization to motor effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology*, 187(4), 397-404. doi: 10.1007/s00213-006-0440-1
- Estrada, E. (1985). *Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez*. México: Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia.
- Ferreira, V. M. M., & Morato, G. S. (1996). Influence of age and of pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus-maze apparatus. *Addiction Biology*, 1(4), 395-404. doi: 10.1080/1355621961000125016
- File, S. E., Kenny, P. J., & Cheeta, S. (2000). The Role of the Dorsal Hippocampal Serotonergic and Cholinergic Systems in the Modulation of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(1), 65-72. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00198-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00198-2)
- Garakani, A., Mathew, S. J., & Charney, D. S. (2006). Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 73(7), 941-949.
- Gasparini, F., Lingenhöhl, K., Stoehr, N., Flor, P. J., Heinrich, M., Vranesic, I., . . . Kuhn, R. (1999). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 38(10), 1493-1503. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00082-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00082-9)
- González-Cortazar, M., Tortoriello, J., & Alvarez, L. (2005). Norecofriedelanes as Spasmolytics, Advances of Structure-Activity Relationships. *Planta Med*, 71(08), 711-716. doi: 10.1055/s-2005-871224
- Gorman, J. M. (2003). Treating Generalized Anxiety Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 65(2), 24-29.
- Grillon, C., Cordova, J., Levine, L., & Morgan, I. I. I. C. (2003). Anxiolytic effects of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist (LY354740) in the fear-potentiated startle paradigm in humans. *Psychopharmacology*, 168(4), 446-454. doi: 10.1007/s00213-003-1444-8
- Herrera-Ruiz, M., González-Cortazar, M., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Álvarez, L., Ramírez, G., & Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic Effect of Natural Galphimines from *Galphimia glauca* and their Chemical Derivatives. *Journal of Natural Products*, 69(1), 59-61. doi: 10.1021/np050305x

- Herrera-Ruiz, M., González-Cortazar, M., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Álvarez, L., & Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic effect of natural galphimines from *Galphimia glauca* and their chemicals derivatives. *Journal of Natural Products*, 69, 59-61.
- Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, J. E., De Lima, T. C. M., Avilés-Montes, D., Pérez-García, D., González-Cortazar, M., & Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 13(1), 23-28.
- Hodges, H., Green, S., & Glenn, B. (1987). Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology*, 92(4), 491-504. doi: 10.1007/BF00176484
- Huettner, J., & Bean, B. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 1307-1311.
- Jacobson, L. H., & Cryan, J. F. (2008). Evaluation of the anxiolytic-like profile of the GABAB receptor positive modulator CGP7930 in rodents. *Neuropharmacology*, 54(5), 854-862. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.004>
- Jiang X. , Chen A. , Smerin S. , Zhang L , & H., L. (2011). Pharmacology of 5-HT₂ Modulation of Amygdala & Hypothalamus in Anxiety Disorders. In V. V. Kalining (Ed.), *Anxiety disorders* (pp. 39-50). Rijeka, Croatia: InTech.
- Jiménez-Ferrer, E., Herrera-Ruiz, M., Ramírez-García, R., Herrera-Arellano, A., & Tortoriello, J. (2011). Interaction of the natural anxiolytic Galphimine-B with serotonergic drugs on dorsal hippocampus in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 724-729. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.029>
- Kalining, V. V. (2011). *Anxiety disorders* (V. V. Kalining Ed.). Rijeka, Croatia: InTech.
- Kang-Park, M. H., Wilson, W. A., & Moore, S. D. (2004). Differential actions of diazepam and zolpidem in basolateral and central amygdala nuclei. *Neuropharmacology*, 46(1), 1-9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00340-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00340-X)
- Kaufmann, W. A., Humpel, C., Alheid, G. F., & Marksteiner, J. (2003). Compartmentation of alpha 1 and alpha 2 GABAA receptor subunits within rat extended amygdala: implications for benzodiazepine action. *Brain Research*, 964(1), 91-99. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04082-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04082-9)
- Kent, J. M., Mathew, S. J., & Gorman, J. M. (2002). Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biological Psychiatry*, 52(10), 1008-1030. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01672-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01672-4)
- Kim, J., & Gorman, J. (2005). The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 4(5-6), 335-347. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnr.2005.03.008>
- Klodzinska, A., Tatarczyńska, E., Chojnacka-Wójcik, E., Nowak, G., Cosford, N., & Pilc, A. (2004). Anxiolytic -like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABA_(A) signaling. *Neuropharmacology*, 47, 342-350.
- Klodzinska, A., Tatarczyńska, E., Chojnacka-Wójcik, E., Nowak, G., Cosford, N. D. P., & Pilc, A. (2004). Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABAA signaling. *Neuropharmacology*, 47(3), 342-350. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.013>

- Korpi, E. R., Gründer, G., & Lüddens, H. (2002). Drug interactions at GABAA receptors. *Progress in Neurobiology*, 67(2), 113-159. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00013-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00013-8)
- Läck, A. K., Diaz, M. R., Chappell, A., DuBois, D. W., & McCool, B. A. (2007). Chronic Ethanol and Withdrawal Differentially Modulate Pre- and Postsynaptic Function at Glutamatergic Synapses in Rat Basolateral Amygdala. *Journal of Neurophysiology*, 98(6), 3185-3196. doi: 10.1152/jn.00189.2007
- Latysheva, N. V., & Rayevsky, K. S. (2003). Chronic neonatal N-methyl-d-aspartate receptor blockade induces learning deficits and transient hypoactivity in young rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(5), 787-794. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00110-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00110-6)
- Li, H., Chen, A., Xing, G., Wei, M.-L., & Rogawski, M. A. (2001). Kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation in the amygdala. *Nature Neuroscience*, 4(6), 612-620.
- Lister, R. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180-185. doi: 10.1007/bf00177912
- Löscher, W., Dekundy, A., Nagel, J., Danysz, W., Parsons, C. G., & Potschka, H. (2006). mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists lack anticonvulsant efficacy in rodent models of difficult-to-treat partial epilepsy. *Neuropharmacology*, 50(8), 1006-1015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.02.001>
- Marowsky, A., Fritschy, J.-M., & Vogt, K. E. (2004). Functional mapping of GABAA receptor subtypes in the amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 20(5), 1281-1289. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03574.x
- Martínez, M. (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. D. F, México. : Ed. Botas.
- Mauk, M., Peroutka, S., & Kocsis, J. (1988). Buspirone attenuates synaptic activation of hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience*, 8(1), 1-11.
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3), 257-332. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00003-3)
- Medina-Mora, M. E., Borges, G., Lara, C., Benjet, C., Blanco, J., Fleiz, C., . . . Aguilar-Gaxiola, S. (2003). Prevalencia de Trastornos Mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, 26(4), 1-16.
- Millan, M. J., & Brocco, M. (2003). The Vogel conflict test: procedural aspects, γ -aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 67-96. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01275-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01275-5)
- Miserendino, M. J. D., Sananes, C. B., Melia, K. R., & Davis, M. (1990). Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 345(6277), 716-718.
- Mombereau, C., Kaupmann, K., Gassmann, M., Bettler, B., van der Putten, H., & Cryan, J. F. (2005). Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB(2) receptor subunits. *NeuroReport*, 16(3), 307-310.
- Mombereau, C., Kaupmann, K., van der Putten, H., & Cryan, J. F. (2004). Altered response to benzodiazepine anxiolytics in mice lacking GABAB(1) receptors. *European Journal of Pharmacology*, 497(1), 119-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.036>
- Monroy-Ortiz, C., & Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos* (pp. 182). Morelos, México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos. .

- Nash, J., & Nutt, D. (2007). Pharmacotherapy of anxiety. In D. R. Sibley, I. Hanin, M. Kuhar & P. Skolnick (Eds.), *Handbook of Contemporary Neuropharmacology* (Vol. 2, pp. 59-91): Wiley.
- Nemeroff, C. B. (2003). The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacology bulletin*, 37(4), 133-146.
- Niehoff, D., & Kuhar, M. (1983). Benzodiazepine receptors: localization in rat amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 3(10), 2091-2097.
- Olsen, R. (2002). GABA In L. Kenneth, Charney, D., Coyle JT., Nemeroff, C. (Ed.), *Neuro Psychopharmacology. The Fifth Generation of Progress* (5 ed., pp. 159-168). Chichester, United Kingdom.: Ed. Williams and Wilkins Publishers.
- Padovan, C. M., & Guimarães, F. S. (2004). Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(1), 15-19. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2003.09.015>
- Palazzo, E., Fu, Y., Ji, G., Maione, S., & Neugebauer, V. (2008). Group III mGluR7 and mGluR8 in the amygdala differentially modulate nocifensive and affective pain behaviors. *Neuropharmacology*, 55(4), 537-545. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.007>
- Pape, H.-C., & Pare, D. (2010). Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiological Reviews*, 90(2), 419-463. doi: 10.1152/physrev.00037.2009
- Paré, D., Quirk, G. J., & Ledoux, J. E. (2004). New Vistas on Amygdala Networks in Conditioned Fear. *Journal of Neurophysiology*, 92(1), 1-9. doi: 10.1152/jn.00153.2004
- Paxinos, G., & Watson, C. (2014). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (7th ed.). San Diego, U.S.A.: Elsevier Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(3), 525-529. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)
- Pietraszek, M., Sukhanov, I., Maciejak, P., Szyndler, J., Gravius, A., Wisłowska, A., . . . Danysz, W. (2005). Anxiolytic-like effects of mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists in rats. *European Journal of Pharmacology*, 514(1), 25-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.03.028>
- Pitkänen, A., Savander, M. I. A., Nurminen, N., & Ylinen, A. (2003). Intrinsic Synaptic Circuitry of the Amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 985(1), 34-49. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07069.x
- Poleszak, E., Szewczyk, B., Kędzierska, E., Właż, P., Pilc, A., & Nowak, G. (2004). Antidepressant- and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(1), 7-12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2004.01.006>
- Prieto-Gómez, B., Tortoriello, J., Vázquez-Alvarez, A., & Reyes-Vázquez, C. (2003). Galphimine B Modulates Synaptic Transmission on Dopaminergic Ventral Tegmental Area Neurons. *Planta Med*, 69(01), 38-43. doi: 10.1055/s-2003-37043

- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 3-33. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Purves, D., Augustin, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., & Williams, S. (2004). *Neuroscience* (3 ed.). Sunderland, MA, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.
- Quirk, G. J., & Gehlert, D. R. (2003). Inhibition of the Amygdala: Key to Pathological States? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 985(1), 263-272. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07087.x
- Rocca, P., Fonzo, V., Scotta, M., Zanalda, E., & Ravizza, L. (1997). Paroxetine efficacy in the treatment of generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 95(5), 444-450. doi: 10.1111/j.1600-0447.1997.tb09660.x
- Rudolph, U., & Möhler, H. (2006). GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 18-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.003>
- Rzedowski, J., & Equihua, M. (1987). Flora. In S. d. E. Pública & I. N. d. A. e. Historia (Eds.), *Atlas Cultural de México* (pp. 57). D. F., México: Grupo Editorial Planeta.
- Sanders, S. K., & Shekhar, A. (1995). Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injection of GABAA and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. *Biological Psychiatry*, 37(7), 473-476. doi: 10.1016/0006-3223(94)00183-4
- Sanders, S. K., & Shekhar, A. (1995). Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(4), 701-706. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00153-N](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(95)00153-N)
- Schoepp, D. D., Wright, R. A., Levine, L. R., Gaydos, B., & Potter, W. Z. (2003). LY354740, an mGlu2/3 Receptor Agonist as a Novel Approach to Treat Anxiety/Stress. *Stress*, 6(3), 189-197. doi: doi:10.1080/1025389031000146773
- Shekhar, A., Sajdyk, T. J., Gehlert, D. R., & Rainnie, D. G. (2003). The Amygdala, Panic Disorder, and Cardiovascular Responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 985(1), 308-325. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07090.x
- Shigemoto, R., Nomura, S., Ohishi, H., Sugihara, H., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1993). Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 163(1), 53-57. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90227-C](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(93)90227-C)
- Siemiątkowski, M., Sienkiewicz-Jarosz, H., Członkowska, A. I., Bidziński, A., & Płaźnik, A. (2000). Effects of Buspirone, Diazepam, and Zolpidem on Open Field Behavior, and Brain [3H]Muscimol Binding After Buspirone Pretreatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(3), 645-651. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00200-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00200-8)
- Simeone, T. A., Sanchez, R. M., & Rho, J. M. (2004). Molecular Biology and Ontogeny of Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System. *Journal of Child Neurology*, 19(5), 343-360. doi: 10.1177/088307380401900507
- Spooren, W. P. J. M., Vassout, A., Neijt, H. C., Kuhn, R., Gasparini, F., Roux, S., . . . Gentsch, C. (2000). Anxiolytic-Like Effects of the Prototypical Metabotropic Glutamate Receptor 5 Antagonist 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine in Rodents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(3), 1267-1275.

- Stachowicz, K., Kłak, K., Kłodzińska, A., Chojnacka-Wojcik, E., & Pilc, A. (2004). Anxiolytic-like effects of PHCCC, an allosteric modulator of mGlu4 receptors, in rats. *European Journal of Pharmacology*, 498(1–3), 153-156. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.001>
- Stankevicius, D., Rodrigues-Costa, E. C., Camilo Flório, J., & Palermo-Neto, J. (2008). Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. *Neuropharmacology*, 54(2), 300-308. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.09.011>
- Steckler, T., Lavreysen, H., Oliveira, A., Aerts, N., Craenendonck, H., Prickaerts, J., . . . Lesage, A. J. (2005). Effects of mGlu1 receptor blockade on anxiety-related behaviour in the rat lick suppression test. *Psychopharmacology*, 179(1), 198-206. doi: 10.1007/s00213-004-2056-7
- Sun, Y.-N., Li, L.-B., Zhang, Q.-J., Hui, Y.-P., Wang, Y., Zhang, L., . . . Liu, J. (2013). The response of juxtacellular labeled GABA interneurons in the basolateral amygdaloid nucleus anterior part to 5-HT_{2A/2C} receptor activation is decreased in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuropharmacology*, 73(0), 404-414. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.021>
- Tatarczyńska, E., Kłodzińska, A., Chojnacka-Wójcik, E., Pałucha, A., Gasparini, F., Kuhn, R., & Pilc, A. (2001). Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 132(7), 1423-1430. doi: 10.1038/sj.bjp.0703923
- Tortoriello, J., & Lozoya, X. (1992). Effect of Galphimia glauca Methanolic Extract on Neuropharmacological Tests. *Planta Med*, 58(03), 234-236. doi: 10.1055/s-2006-961442
- Tortoriello, J., & Ortega, A. (1993). Sedative Effect of Galphimine B, a Nor- seco - triterpenoid from Galphimia glauca. *Planta Med*, 59(05), 398-400. doi: 10.1055/s-2006-959717
- Tortoriello, J., Ortega, A., Herrera-Ruíz, M., Trujillo, J., & Reyes-Vázquez, C. (1998). Galphimine-B Modifies Electrical Activity of Ventral Tegmental Area Neurons in Rats. *Planta Med*, 64(04), 309-313. doi: 10.1055/s-2006-957440
- . Trastornos de ansiedad. (1995). In P. Pichot (Ed.), *DSM-IV Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales* (pp. 401-446). Barcelona, España: Masson, S. A.
- Tzschentke, T. M. (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63(3), 241-320. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00033-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00033-2)
- Ugolini, A., Large, C. H., & Corsi, M. (2008). AMN082, an allosteric mGluR7 agonist that inhibits afferent glutamatergic transmission in rat basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, 55(4), 532-536. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.04.020>
- Vissienon, C., Nieber, K., Kelber, O., & Butterweck, V. (2012). Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin — are they prodrugs? *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(7), 733-740.
- Walsh, R., & Cummins, R. (1975). Mechanisms mediating the production of environmentally induced brain changes. *Psychological Bulletin*, 82, 986-1000.

- Wiley, J. L., Compton, A. D., Holcomb, J. D., McCallum, S. E., Varvel, S. A., H. Porter, J., & Balster, R. L. (1998). Effects of modulation of NMDA neurotransmission on response rate and duration in a conflict procedure in rats. *Neuropharmacology*, 37(12), 1527-1534. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00152-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00152-X)
- Woltering, T. J., Wichmann, J., Goetschi, E., Adam, G., Kew, J. N., Knoflach, F., . . . Gatti, S. (2008). Synthesis and characterization of 1,3-dihydro-benzo[b][1,4]diazepin-2-one derivatives: Part 3. New potent non-competitive metabotropic glutamate receptor 2/3 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(8), 2725-2729.
- Wong, C. G.-T., & Snead, O. C. (2001). The GABAA Receptor: Subunit-Dependent Functions and Absence Seizures. *Epilepsy Currents*, 1(1), 1-5. doi: 10.1046/j.1535-7597.2001.00009.x
- Yap, J., Covington, H., III, Gale, M., Datta, R., & Miczek, K. (2005). Behavioral sensitization due to social defeat stress in mice: antagonism at mGluR5 and NMDA receptors. *Psychopharmacology*, 179(1), 230-239. doi: 10.1007/s00213-004-2023-3
- Zarate, C. A., Jr, Singh, J. B., Carlson, P. J., & et al. (2006). A randomized trial of an n-methyl-d-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry*, 63(8), 856-864.
- Zhang, Z.-J. (2004). Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences*, 75(14), 1659-1699. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.014>

13. Anexos

Anexo 1. Carta de aceptación de publicación del artículo producto de la investigación de los estudios de Doctorado.



Oct 22, 2015

FONDO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD RFC: FIS080815K31
ADDRESS: CUAUHTEMOC 330 4 DOCTORES DISTRITO FEDERAL. 06720

Subject: Acceptance Letter for Article No. 73755-IJP-ANSI

It's a great pleasure for us to inform you that below mentioned manuscript has been accepted for publication in International Journal of Pharmacology as Research Article on the recommendation of the reviewers.

Title: Pharmacological Interaction Between Galphimine-A, a Natural Anxiolytic Compound, and GABAergic Drugs
Author's Name: Dante Avilés-Montes, Maribel Herrera-Ruiz, Rubén Román-Ramos, Enrique Jiménez-Ferrer, Manasés González-Cortazar, Alejandro Zamilpa and Jaime Tortoriello

Receiving Date: July 13, 2015

Revised on: October 14, 2015

Regards

A blue handwritten signature that appears to read "Imran Pasha".

M. Imran Pasha
Publication Manager

Anexo 2. Manuscrito enviado a la revista el cual fue aceptado para su publicación. El artículo presenta parte de los resultados de la investigación realizada en el Doctorado.

Pharmacological Interaction between Galphimine-A, a Natural Anxiolytic Compound, and GABAergic Drugs.

¹, ²Dante Avilés-Montes, ¹Maribel Herrera-Ruiz, ²Rubén Román-Ramos, ¹Enrique Jiménez-Ferrer, ¹Manasés González-Cortazar, ¹Alejandro Zamilpa and ¹Jaime Tortoriello

¹Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, México

²Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, Distrito Federal, México 09340

Corresponding Author: Dra. Maribel Herrera-Ruiz. Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, México. Tel./Fax: +52-777-361-2155. cibis_herj@yahoo.com.mx

ABSTRACT

Galphimia glauca is a plant species that has been used in Mexican Traditional Medicine for the treatment of Central nervous system disorders. Was demonstrated that the standardized extract of *G. glauca*, by means of double-blind, controlled, and randomized clinical studies, possesses therapeutic effectiveness in patients with generalized anxiety disorder. In the active extract, nor-secotriterpenes Galphimines, Galphimine-A (G-A) and Galphimine-B (G-B) are prominent for their anxiolytic effect. In the present work, the oral administration of different doses of G-A, in ICR male mice submitted to the Elevated Plus Maze (EPM) test, was capable of inducing a significant anxiolytic effect, while any of the doses modified the spontaneous motor activity of the mice in the Open field test (OFT). The administration of G-A (30 mg/kg, *p.o.*) in mice inhibited the anxiogenic effect of picrotoxin (PTX, 2 mg/kg, *i.p.*), but not of bicuculline (BCC, 5 mg/kg, *i.p.*) and pentylentetrazole (PTZ, 10 mg/kg, *i.p.*) in the EPM. The combination of G-A with these drugs was evaluated by means of *in vivo* extracellular recordings in basolateral amygdala (BLA). A dose-dependent increase of the firing rate on BLA neurons was induced by the administration (*i.v.*) of different doses of G-A, while diazepam (DZP) decreased the firing rate. The co-administration of G-A with DZP or flumazenil (FMZ) did not modify the effect produced by these drugs on the firing rate. However, the co-administration of G-A modified the effect produced by PTX. G-A was able to produce an anxiolytic effect when administered at different doses orally in mice, without inducing an associated sedative effect. Electrophysiological recordings showed that the effect produced by G-A is different of that of DZP and suggest that G-A do not interact directly with the

GABAergic system (transmission mechanism for the γ -aminobutyric acid –GABA–), while it was able to modify the effect produced by PTX, BCC and Phaclofen evidencing a different action mechanism.

Key words: *Galphimia glauca*; anxiety; Galphimine-A; Elevated plus-maze test; Open field test; Bicuculline; Picrotoxin; Pentylentetrazole.

INTRODUCTION

In the search for new drugs that could be useful for the treatment of anxiety, medicinal plants are studied as an important source of novel bioactive molecules; *Galphimia glauca* (Malpighiaceae) (Tortoriello and Ortega, 1993; Herrera-Ruiz *et al.*, 2006) is a Mexican medicinal species, from which a characteristic group of nor-secotriterpenes, now named Galphimines, has been isolated. Highlighted among these are Galphimine-A (G-A) and Galphimine-B (G-B) (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006), to which the anxiolytic effect of this species has been attributed. Recently, the clinical evaluation of a phytopharmaceutical elaborated with the standardized extract (in its galphimine content) of *Galphimia glauca* was reported. This product, administered during 4 weeks, demonstrated that it possesses therapeutic effectiveness similar to that exerted by Lorazepam in patients with a diagnosis of Generalized anxiety disorder (GAD), however without evidencing important adverse effects (Herrera-Arellano *et al.*, 2007). Another double-blind, controlled clinical study demonstrated that administration of the phytopharmaceutical for 15 weeks in patients with GAD was safe to use and well tolerated (Herrera-Arellano *et al.*, 2012). Studies in animal *in vivo* tests have also shown that the extract from *G. glauca*, standardized in its galphimines content, is capable of exerting an anxiolytic effect on the EPM test (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006; Herrera-Ruiz *et al.*, 2006).

In an attempt to know the mechanism of action of G-B, it has been evidenced, by means of electrophysiological recordings, that this nor-secotriterpene is capable of modulating serotonergic transmission in the dorsal hippocampus of anesthetized rats (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2011). It was able to diminish the discharge frequency of dopaminergic neurons of the Ventral tegmental area (VTA) by means of a mechanism of action independent from the GABAergic system (Tortoriello *et al.*, 1998; Prieto-Gómez *et al.*, 2003).

Anxiety is a normal emotional response to potential threats or stresses, and is associated with a variety of psychological disorders when it becomes excessive (Clement and Chapouthier, 1998; Cannistraro, 2003). Anxiety disorders are a heterogeneous group of psychiatric disorders with no clear knowledge of their etiology and pathogenesis. Several familial, biological, and genetic risk factors have been invoked for the Obsessive-compulsive disorder (OCD) or the Panic disorder (PD), however to date none has shown a main role in their etiology (Cavallini and Bellodi, 2001). Anxiety disorders have a high impact on daily life and cause a great deal of suffering for the individual patient.

The amygdala plays an essential role in mediating emotions such as anxiety (Davis *et al.*, 1994; LeDoux, 2003). The primate amygdala is located in the anteromedial part of the temporal lobe, where it lies ventromedial to the striatum and anterior to the ventral portion of the hippocampal formation. It has a similar position in non-primates, such as rat and cat (McDonald, 1998). The basolateral amygdala (BLA) has been widely studied

as one of the critical components in the neural circuitry, mediating anxiety-related states and behaviors (Davis, 1998); it is a cortical-like structure consisting of Glutamatergic principal neurons and local GABAergic inhibitory neurons (Pape and Pare, 2010). The role of GABAergic cells is particularly important, as their inhibitory action provides constant silencing of the main glutamatergic neurons of the BLA (Gaudreau and Pare, 1996). Suppression of inhibition can increase the firing rate and synchronization of glutamatergic neurons during fear (Paré and Collins, 2000).

From the active extract of *Galphimia glauca*, other galphimines have been isolated and identified, for example, G-E, which is found at a greater concentration in the plant however that does not exhibit activity in anxiety tests. Through a simple chemical reaction, G-E (inactive) is transformed into G-A (active); thus, in this manner it is possible to possess a greater amount of the anxiolytic compound. In the present work, we evaluated (by means of the EPM test in mice, as well as by unitary extracellular recordings in BLA of male rats) the effect produced by different doses of G-A on anxiety and its interaction with potent excitatory substances of the CNS that act on the GABA_A receptor.

MATERIALS AND METHODS

Plant material: *Galphimia glauca* was collected from a controlled crop in Morelos State, Mexico. Taxonomic identification was performed by Abigail Aguilar-Contreras, M.Sc., the Herbarium head. A voucher sample was deposited in the Mexican Institute of Social Security Herbarium with code number IMSSM-8646. Plant material was dried under dark conditions at room temperature for 2 weeks. Afterward, in order to obtain particles 3–5-mm in size, the plant material was submitted to an electric grinder mill.

Extract preparation: For obtaining the galphimines, the ground plant material (aerial parts) (7.26 kg) was macerated with *n*-hexane (16.8 L, 3 times) for its degreasing, and later was submitted to extraction with a mixture of ethyl acetate and methanol (50:50; 3 times) (González-Cortazar et al., 2005). The extract obtained (310.8 g, 4.27%) was resuspended in solvents with ascending polarity as follows: *n*-hexane (600 mL, Merck); chloroform (500 mL, Merck); ethyl acetate (500 mL, Merck), and methanol (500 mL, Merck). The solvent was eliminated under conditions of distillation by low pressure in a Heidolph-Laborota 4000 rotary evaporator (Germany), finally obtaining fractions of *n*-hexane (8 g, 0.01%), ethyl acetate (51.7 g, 0.71%), chloroform (57.4 g, 0.79%), and methanol (189.2 g, 2.6%).

Extraction of Galphimine-A (1): The methanolic fraction (150 g), in which the content was mainly the mixture of galphimines, was passed through a gravitational chromatographic column (400 × 90 mm) previously packed with silica gel 60 (600 g, 40–63 μm, Merck). We employed a chloroform-acetone-methanol gradient system as mobile phase, beginning with 100% of the solvent of least polarity and ending with 100% of methanol. This process was monitored by Thin-layer chromatography (TLC) until obtaining a fraction with the mixture of triterpenes (galphimines). We obtained 45 fractions that, based on the similarity of their content, were regrouped into the following eight groups: GgF-A (1–3, 100:0:0); GgF-B (4–19, 100:0:0); GgF-C (20–24, 90:10:0%); GgF-D (25–27, 90:10:0); GgF-E (28–32, 80:20:0); GgF-F (33–36, 70:30:0); GgF-G

(37–44, 50:50:0), and GgF-H (45, 0:0:100). The GgF-B fraction (100 g, 66.6%) contains a mixture of galphimines; thus, it was submitted to chemical separation through a gravitational chromatographic column (500 × 50 mm). The solvent system in this case was a gradient composed of *n*-hexane-ethylacetate-methanol, with a gradual increase in polarity, obtaining 48 fractions that were regrouped into the following four groups: GgFB-I (1–8, 70:30:0); GgFB-II (9–11, 70:30:0); GgFB-III (12–16, 50:50:0), and GgFB-IV (17–48, 50:50:10). The GgFB-IV fraction (7.9 g, 7.9%) contained a high amount of Galphimine-E (G-E) and a low concentration of G-A (0.2 g, 1). Due to the high yield of G-E (Galphimine-E; 7.9 g) in this fraction, it was utilized for obtaining G-A by means of a previously reported chemical reaction (González-Cortazar et al., 2005) of transformation by hydrolysis. At the end of the reaction, the sample was concentrated at reduced pressure and afterward was taken to complete dryness through lyophilization. The reaction product was obtained (6.55 g, 82.91%), which was separated by gravitational column chromatography (300 × 20 mm) with silica gel (300 g, 70-230 mesh, Merck). Utilizing a chloroform-acetone-methanol gradient as mobile phase, 50 fractions were obtained, which were regrouped into the following five groups: GARx-1 (1–15, 100:0:0); GARx-2 (16–28, 90:10:0); GARx-3 (29–34, 80:20:0%); GARx-4 (35–49, 70:30:0), and GARx-5 (50, 0:0:100). The GARx-2 fraction was recrystallized with acetone-methanol (7:3 v/v), obtaining crystals (2.8 g, 42.74%) that were identified by NMR of ¹H and ¹³C as Galphimine-A (G-A) (1).

NMR spectra analysis: The spectra of NMR¹H and ¹³C of G-A, dissolved in CD₃OD, were obtained in NMR Avance DMX500[®] Bruker 500 MHz equipment. The chemical displacements were reported in parts per million (ppm) and Tetramethylsilane (TMS) was employed as internal reference.

Animals: Male albino ICR mice weighing around 35 g were used (Harlan, Mexico City) for the Elevated plus maze (EPM) test. Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Mexico City) weighing 250–350 g were used for extracellular recordings. All animals were maintained under standard laboratory conditions at 25°C, with 12-h light/12-h dark cycles, with lights turned on at 07:00 a.m., and with free access to water and standard food pellets (Harlan rodent diet). The animals were allowed at least 3 weeks to adapt to the laboratory environment prior to initiating the experiments. All experimental procedures were carried out according to a protocol approved by the Institutional Research Committee in compliance with the Official Mexican Regulation that dates from 1999 (NOM-062-ZOO-1999). Minimal number of animals (n = 8) and duration of observation required to obtain consistent data were employed. The experimental protocol was approved by the Local Ethics Committee and was assigned control number R-2010-1701-23.

Drugs: In the experiments, we utilized the following substances: Tween 20 (0.5%) was used as negative control group, G-A (7.5, 15, 30, and 45 mg/kg, dissolved in Tween 20, 0.5%); GABAergic system modulators; Diazepam (DZP, 1.0 mg/kg, Pfizer) was employed as an anxiolytic and sedative drug, and it is an allosteric modulator of the GABA-A receptor; bicuculline methiodide (BCC, 5 mg/kg), as GABA-A receptor antagonist; picrotoxin (PTX, 2 mg/kg), as GABA-A receptor antagonist, binds to the GABA receptor-linked chloride (Cl) channel, and is an anxiety inducer, and pentylentetrazole (PTZ, 10 mg/kg) with non-specific action is a CNS stimulant and

induces anxiety. All GABAergic drugs were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Urethane was used as anesthetic drug for the electrophysiological recordings.

Pharmacological design: For *in vivo* behavioral tests, groups of 8 mice were organized. In order to build dose response curves, different doses (1.0, 1.5, 3.25, 7.5, 15, 30, and 45 mg/kg) of G-A were administered orally 1 h prior to the initiation of each test (EPM, OFT). For co-administration experiments, all animals were pretreated with 30 mg/kg of G-A orally (*p.o.*) and 30 min later with one of the different GABAergic drugs by intraperitoneal via (*i.p.*). The doses utilized for each case were as follows: BCC 5 mg/kg; PTX 2.0 mg/kg, and PTZ 10 mg/kg. Finally, 30 min later, each mouse was evaluated in the EPM or OFT tests. DZP (1.0 mg/kg *i.p.*) and Tween 20 solution (*p.o.*) were used as a positive (anxiolytic) and negative control group, respectively. For electrophysiological recordings, treatments were administered with increasing and cumulative doses intravenously (*i.v.*). With the aim to obtain dose-response curves, the following different doses were used: 0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, and 6.0 mg/kg for PHC, BCC, and PTX; 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 10 mg/kg for DZP, and 0.125, 0.75, 1.25, 2.5, 5.0, and 10 mg/kg for PTZ. In order to explore the interaction of G-A with different drugs, G-A was administered at 0.125 mg/kg and later, the cumulative doses of GABAergic drugs.

Elevated plus maze test (EPM): The EPM test is the most frequently used model for assessment of the anxiolytic activity of a new substance, including herbal remedies (Zhang, 2004) in rodents (Pellow et al., 1985; Lister, 1987). The apparatus was constructed of Plexiglas and consisted of two open arms (30 × 5 cm) and two closed arms (30 × 5 cm) with 25-cm walls. The arms extended from a central platform (5 × 5 cm) and the maze was elevated 38.5 cm from the floor of the room. Each animal was placed in the center of the maze, facing one of the closed arms. Number of entries and time on closed and open arms were recorded during a 5-min test. Entry onto an arm was defined as the animal placing all four paws on the arm. All tests were taped with a video camera. After each test, the maze was carefully cleaned with wet tissue paper (10% ethanol solution). Conventional spatial-temporal measurements comprised number of entries (all four paws on open or closed arms and expressed as percentage of total entries on open arms [% EOA]) and time on open or closed arms (expressed as percentage of time on open arms [% TOA]).

Open field test (OFT): The OFT was employed to evaluate the exploratory activity of the animals (Archer, 1973). Ambulatory behavior was assessed in an open-field test (OFT). The apparatus consisted of transparent acrylic walls and a black floor box measuring 30 × 30 × 15 cm in height. The floor of the arena was divided into nine squares equal in area. At the start of each trial, a mouse was placed in the central square and was allowed to explore the arena freely. Number of squares crossed (with all four paws) and number of rearings (R) were counted in a 5-min session. The equipment was cleaned with a solution of 10% ethanol between tests in order to mask animal clues.

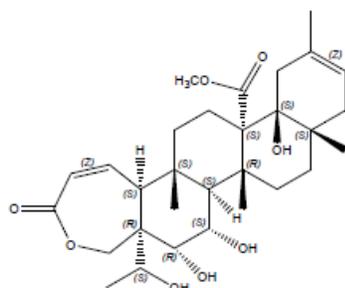
***In situ* extracellular recording in basolateral amygdala (BLA):** Rats were anesthetized (*i.p.*) with urethane (1.5 g/kg) and were subsequently placed in a stereotaxic device (Stoelting, IL, USA). Body temperature was maintained at 37°C throughout the

experiment and, prior to recording, a femoral vein was catheterized for *i.v.* administration of drugs. A midline skin incision was made on the head, and burr holes were drilled into the skull overlying the basolateral amygdala (BLA, the recording site). Coordinates for this area were determined utilizing the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 1986). The coordinates used for amygdala centered on 4.8–5.5 mm lateral from midline, 2.5–3.8 mm caudal from bregma. The recording electrodes (single-barrel glass) were constructed from borosilicate glass capillary tubing (2-mm outer diameter, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) by using a horizontal flaming Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co., CA, USA). The electrode was then filled with 2 M NaCl solution containing Fast green by employing a non-metallic microfill syringe needle (World Precision Instruments, Inc.). Recording began no earlier than 30 min after surgery. Signals from the recording electrode were amplified by a headstage connected to the preamplifier prior to being fed into a window discriminator/amplifier (1,000X gain, 100–4,000-Hz band pass, Grass PS, Series AC Pre-Amplifier) with low cutoff of 200 Hz and a high cutoff of 16 kHz. Signals were displayed on an oscilloscope (Tektronix, Inc., Beaverton, OR, USA) for real time monitoring, as well as on a custom-designed digital acquisition system (Axon). At the beginning of each experimental trial, we conducted a 5-min baseline recording, after which the appropriate treatments were administered. For the G-A dose-response curve, increasing and cumulative doses were administered; the effect on the neuronal firing frequency of each dose was recorded for 3 min. At the end of recording, a positive current through the recording electrode was applied in order to stain the recording area. Finally, the animals were killed by decapitation and the brain was obtained to verify the recording area. Records concerning the basolateral amygdala (BLA) were considered for pharmacological analysis.

Statistical analysis: Statistical analysis was performed with an SPSS ver. 11.0 software program and based on Analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Dunnett test for behavioral tests), and a Student t test was used to analyze the results of the electrophysiological recordings. A significant difference was established with respect to the control group when the *p* value was <0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of Galphimine-A (1): G-A (1) was obtained in its natural form and by G-E transformation, which also was purified from the *Galphimia glauca* extract. Corroboration of the structure of G-A was carried out by comparison of the spectroscopic data of the Nuclear magnetic resonance (NMR) of ¹H and ¹³C described in the literature (González-Cortazar *et al.*, 2005), in addition to comparison with a standard sample of G-A isolated from the plant.



1

In vivo behavioral tests

Elevated plus maze test (EPM): Mice that received different doses of G-A by oral pathway (1.0, 1.5, 3.25, 7.5, 15, 30, and 45 mg/kg) presented a significant ($*p < 0.05$) increment in the percentage of Entries on open arms (%EOA) and percentage of Time spent on open arms (%TOA) in the EPM test, when compared with the control group (Figure 1). This effect was dose-dependent and observed even at the lowest dose, the values of EOA and TOA for 1.0 mg/kg were 36.48% and 38.25%, while for 45 mg/kg were 60.09% and 63.55%, respectively. The Effective dose 50 (ED₅₀) of G-A for the %TOA was 0.44 mg/kg and maximal Effect (E_{max}) was 55.84%, while for %EOA, the ED₅₀ was 0.51 mg/kg with E_{max} = 55.98%. DZP at 1.0 mg/kg induced a significant increment in both parameters ($*p < 0.05$).

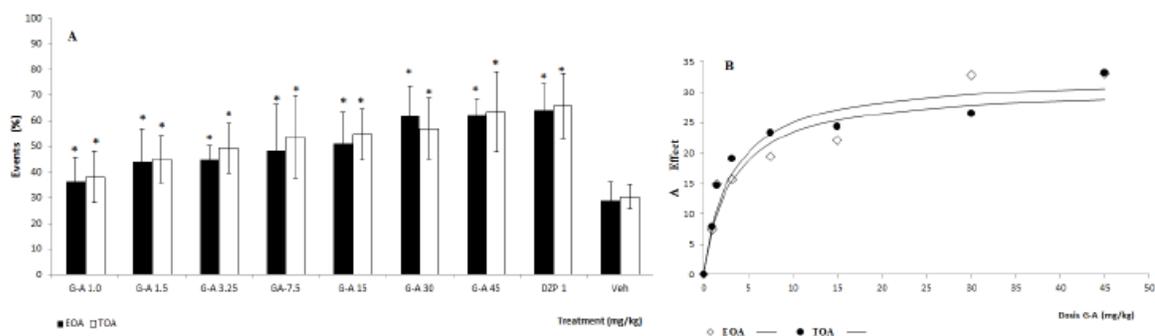


Fig. 1: Effect produced by the oral administration of different doses of Galphimine-A (G-A) on the percentage of Entries to open arms (%EOA) and Time spent on open arms (%TOA) of mice in the EPM test. (B). Dose-response curve of Δ of activity of G-A respect to vehicle ($G-A_{EOA} - Veh_{EOA}$). One-way Analysis of variance (ANOVA) post-hoc Dunnett test ($n = 8$; mean \pm Standard deviation [SD]), $*p < 0.05$ (in comparison with the Vehicle [Veh]).

In Figure 2 are shown the results of the administration of GABAergic drugs alone and in combination with G-A. Intraperitoneal (*i.p.*) administration of PTX (2 mg/kg), or PTZ (10 mg/kg) induced significant diminution of %EOA and %TOA in comparison with the Vehicle (Veh) ($*p < 0.05$), although BICC (5 mg/kg) also induced a decrement of these

parameters, however this effect was not different to Veh ($p > 0.05$). The combination of G-A (30 mg/kg) with BICC or PTZ did not induce any difference respect to the drugs alone, and the co-administration of G-A with PTX provoked an increment of %EOA and %TOA in comparison with PTX alone ($p < 0.05$) and it was also similar to Veh, although different to the G-A group ($p < 0.05$).

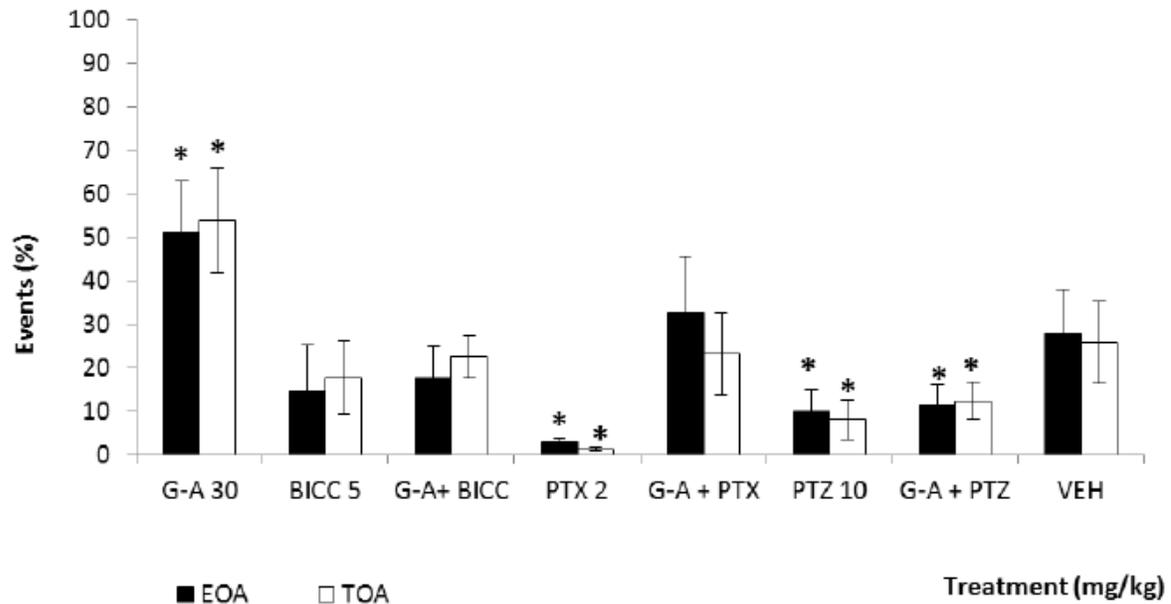


Fig. 2: Effect produced by administration of Bicuculline (BICC), Picrotoxin (PTX), and Pentylentetrazole (PTZ) and each of this drugs in combination with G-A on the percentage of Entries on open arms (%EOA) and Time spent on open arms (%TOA) of ICR mice on the Elevated plus maze (EPM) test. One-way Analysis of variance (ANOVA) post-hoc Dunnett test ($n = 8$; mean \pm Standard deviation [SD]), $*p < 0.05$ in comparison with Vehicle (Veh).

Open field test (OFT): The animals treated with DZP showed a diminution in total number of crossings (TC) and rearings (R) during the OFT test, an effect that was significantly different from that of the negative control group ($*p < 0.05$, Veh). Different doses of G-A, did not provoke any change of these parameters, in comparison with Veh control group ($p > 0.05$). The GABAergic antagonists PTX and PTZ produced a significant decrement ($*p < 0.05$) of these parameters, however BCC did not induce any change, when they were compared with the negative control group ($p > 0.05$) (Table 1).

Table 1: Effect produced by oral administration of different doses of Galphimine-A (G-A) and different GABAergic drugs on Total number of Crossings (TC) and on number of vertical Rearings (R) of ICR mice exposed to the open field paradigm.

Treatment (mg/kg)	Total crossings (TC)	Rearings (R)
Vehicle (Veh), 100 µl/10 g	86.8 ± 7.0	36.6 ± 5.2
G-A 1.0	98.8 ± 19.3	36.8 ± 12.1
G-A 1.5	97.2 ± 20.7	40.2 ± 7.2
G-A 3.25	91.6 ± 15.2	32.9 ± 8.9
G-A 7.5	81.4 ± 3.2	32.2 ± 6.6
G-A 15	83.2 ± 10.7	31.4 ± 6.5
G-A 30	87.4 ± 4.7	30.6 ± 5.5
G-A 45	87.8 ± 7.4	34.6 ± 5.8
DZP 1.5	59.2 ± 4.8*	15.6 ± 3.3*
BCC 5.0	91.4 ± 5.7	32.6 ± 3.8
PTX 2.0	39.6 ± 15.4*	16.4 ± 8.1*
PTZ 10	60.4 ± 12.5*	15.4 ± 3.3*
BCC 5.0 + G-A 30	82.6 ± 7.7	27.2 ± 7.7
PTX 2.0 + G-A 30	37.6 ± 11.3*	10.4 ± 5.9*
PTZ 10.0 + G-A 30	63.0 ± 12.3*	36.6 ± 5.2

The values represent the mean ± Standard Deviation of the mean. * $P < 0.05$, compared with the Vehicle (Veh): one-way Analysis of variance (ANOVA) post-hoc Dunnett test ($n = 8$). G-A = Galphimine A; DZP = diazepam; BCC = bicuculline; PTX = picrotoxin; PTZ = pentylenetetrazole.

Groups of animals that were administered with a GABA_A antagonist (BCC, PTX or PTZ) plus G-A (30 mg/kg) evidenced that G-A (30 mg/kg) was unable to modify the effect produced by this drugs upon the TC and R parameters, which was similar to that obtained by the administration of these drugs alone ($p > 0.05$) (Table 1).

It has been reported that G-A is one of the characteristic triterpenes of the secondary metabolism of the plant species *Galphimia glauca*, and it has been demonstrated (in pharmacological tests *in vivo*) that it exerts an anxiolytic effect when administered at a 15 mg/kg dose *i.p.* (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006). In the present work, the anxiolytic effect of this compound was corroborated however, in this case, G-A was administered by the oral route. This allowed affirmation that this substance, highly liposoluble, acts directly on the CNS. It is important to highlight that there are reports of other natural compounds isolated from medicinal plants, such as some flavonoids (quercetin and kaempferol), which exert an anxiolytic effect only when administered orally to mice, although when the *i.p.* route was used, the effect is not observed. Thus, it is proposed that they act as pro-drugs (Vissienon *et al.*). In this case, the response of the mice to oral administration of G-A was very similar to that produced when it was administered *i.p.*, which was reported by Herrera-Ruiz *et al.* (Herrera-Ruiz *et al.*, 2006). In this report, it was indicated that *i.p.* administration of G-A at a dose of 15 mg/kg caused a significant increase in EOA (48%) and TOA (53%) parameters while, in the present work, the oral administration (at the same dose) achieved an increase in EOA of 61% and in TOA of 52%. It can be appreciated that Time spent on open arms (TOA) has remained practically the same; this parameter is the main one employed in EPM validation, in terms of

considering a substance as an anxiolytic. During the assay, it was also observed that the effect on the EOA and TOA parameters produced by G-A was dose-dependent. The latter, demonstrates that the margin of activity of G-A on the anxiety disorder (analyzed in mice with the EPM test) is broad and that this range of action did not induce a sedative effect, as can be appreciated in the case of the benzodiazepines. BDZ, in restricted dose ranges, give rise to an anxiolytic effect and even to a sedative and hypnotic effect. These substances are employed experimentally to validate procedures that permit the evaluation of new drugs with potential anxiolytic effect, such as the EPM. This test has sensitivity in the exploration of anxiolytic and anxiogenic drugs (Pellow *et al.*, 1985), whose mechanism of action is utilizing benzodiazepinic receptors. However, the EPM test is also sensitive to substances that possess a non-benzodiazepinic mechanism of action (Pellow and File, 1986). DZP exerts different biological effects, which are dose-dependent and which range from sedation to anxiolytic and hypnosis (Bousoño, 2009). In the present study, the 1.0-mg/kg dose of DZP administered *i.p.* produced an increase in the number of EOA and TOA in the EPM model, results that have been widely documented in the literature for this drug.

In order to assess whether the anxiolytic triterpene, G-A, is capable of produce its activity by an interaction of GABAergic system, we decided to measure the behavioral results of mice that received a 30-mg/kg dose of G-A co-administered with different substances that represents a useful tool because it induced effects on the CNS by modulating GABA-A receptor, for example BCC (5 mg/kg), a competitive antagonist; PTX (2.0 mg/kg), a non-competitive antagonist of GABA_A receptor chloride channels that blocks the anxiolytic-like effects of diazepam; and PTZ (10 mg/kg), a product with a mechanism of action that is not yet well understood however that represents a useful tool because it induces effects on CNS by modulating GABA-A receptor. All of these compounds have a pro-convulsivant effect and, at low doses, are anxiogenic. In this work, was observed the anxiogenic activity of each drug, because all caused a diminution in EOA and TOA parameters in mice submitted to the EPM test. There exist in the literature data that indicate that PTX (0.03–0.5 mg/kg) and BCC (1–8 mg/kg) do not possess an anxiogenic effect in the EPM test when administered *i.p.* (Clénet *et al.*, 2005); it is probable, at least for the case of PTX, that the lack of effect that these authors report is due to the low doses in comparison with that used in the present work (2.0 mg/kg).

Co-administration of an oral dose of 30 mg/kg of G-A with BCC and PTZ did not cause any change of the behavior of mice in comparison with those animals that received these drugs alone. When G-A was in combination with PTX, a diminution of the anxiogenic effect of this drug was observed. At this moment, apparently, G-A seems-not act on binding site of GABA, although it could be capable of interact with the chloride ion channels of GABA-A receptor.

It has been demonstrated that GABAergic drugs, such as the benzodiazepines, exert their depressor effect on the CNS in a dose-dependent manner, and that activation of this system gives rise to effects such as anxiolytic, sedation, and even hypnosis and death (Bousoño, 2009). DZP can exert an anxiolytic plus a sedative effect, considering this as one of its undesirable side effects and one that justifies its use mainly at night. Experimentally, the anxiolytic effect of DZP at different doses *i.p.*, as well as its effect on motor activity, have been described, and both activities are related according to the dosage increase in the mice (for example, 2.5 and 10 mg/kg). They also exert an

anxiolytic effect, measured as an increase in number of EOA and TOA in the EPM test, and a sedative effect, observed as a diminution in locomotion in the OFT (Klodzinska *et al.*, 2004; Clénet *et al.*, 2005). In another assay, administration of 0.05, 0.2, 0.8, and 1.5 mg/kg *i.p.* of DZP to Wistar rats caused diminution of motor activity in OFT (Siemiątkowski *et al.*, 2000). In agreement with these data, in the present work, we observed that the 1.0-mg/kg dose of DZP caused an anxiolytic effect accompanied by diminution in spontaneous motor activity in the OFT, which is manifested as a parameter of sedation (Aitkenhead *et al.*, 2001). In this test, the animals were placed in a novel environment and, locomotion, number of rearings (R), and number of groomings (G), among other parameters, were measured, which serve to determine the side or non-specific effects of drugs demonstrating anxiolytic activity in the EPM (Choleris *et al.*, 2001). In contrast with DZP, administration of different doses of G-A did not induce changes in locomotor activity neither in the number of R, indicating, at least in the dose evaluated, that this triterpene does not provoke the sedative effects observed with the benzodiazepines. Among the GABAergic drugs, PTX and PTZ caused diminution of motor activity in the OFT, an affect that has been observed in other investigations; for example, administration of subcutaneous doses of 0.6 and 1.0 mg/kg to Swiss albino mice induced a diminution of locomotion parameters in this test (Stankevicius *et al.*, 2008).

When 30 mg/kg of G-A was administered together with the GABAergic antagonists on the OFT, it could be observed that motor activity (TC and R) was not modified respect to animals that received the antagonist drugs alone, which is indicative of no- interaction of G-A with these substances. This test allows us to exclude possible non-specific locomotor effects, of all treatments.

Electrophysiological recordings

Extracellular recording in basolateral amygdala (BLA): A slight dose-dependent increment on the relative index of the firing rate from BLA neurons was induced by the administration (*i.v.*) of different doses (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, and 6 mg/kg) of G-A (Figure 3, 4 and 5) with an $E_{max} = 1.1432$, and an $ED_{50} = 0.0150$ mg/kg.

This effect demonstrates that BLA is sensitive to the effects produced by G-A. Which is a brain area involved in the adjustment of mood conditions, with a high concentration of glutamatergic neurons, and with an important presence of local GABAergic inhibitory neurons (Pape and Pare, 2010). Thus, the increase of firing frequency induced by G-A in BLA could be due to a direct or indirect modulation of the neurotransmission of these endogen messengers. Some experiments for evaluating electrophysiological activity have shown that the chemical and electrical stimulation of neurons in this brain structure is able to alter situations of fear or anxiety. It has been widely observed that the presence of anxiety states is correlated with an increase of neuronal activity at BLA and, consequently, higher excitability of BLA has a tendency to be anxiogenic, while lower excitability of this structure will be anxiolytic (Davis *et al.*, 1994). The anxiolytic drug, DZP, produced an inhibition of relative index of firing rate in BLA (Figure 3A, ■) in a dose- dependent manner, which agrees with the anxiolytic activity (Hodges *et al.*, 1987). The effect produced by G-A on this structure was different to that of DZP when the higher doses were used (Hodges *et al.*, 1987). In this case, G-A produced a slight dose dependent increase of firing rate of BLA. When G-A was co-administered with DZP, the relative index of firing rate was statistically similar to that of the group treated only with

DZP ($p > 0.05$). The results indicated that although both substances are able to exert an anxiolytic effect in behavioral tests such as EPM, there could be a difference on the action mechanism.

In an attempt to investigate a possible interaction with benzodiazepinic receptor, it was tested the combination of G-A with Flumazenil (FMZ) (a benzodiazepine receptor antagonist). This drug was administered at increasing doses, exhibiting a slight increase in the neuronal excitability of BLA. Although this effect was not significantly different with G-A group, the results are in agreement with reports in which substances that block GABAergic transmission induce an anxiogenic effect and decrease neuronal firing rate in this structure (Figure 3B). When G-A was co-administered with FMZ, the firing rate of the dose response curve was increased in comparison with the group treated with FMZ alone (Figure 3B), and with G-A alone. But, again the effect was no different between these groups ($p > 0.05$). This finding indicates that there is no pharmacological interaction between G-A and drugs that modify neurotransmission with the GABA-A receptor, specifically on the benzodiazepine receptor.

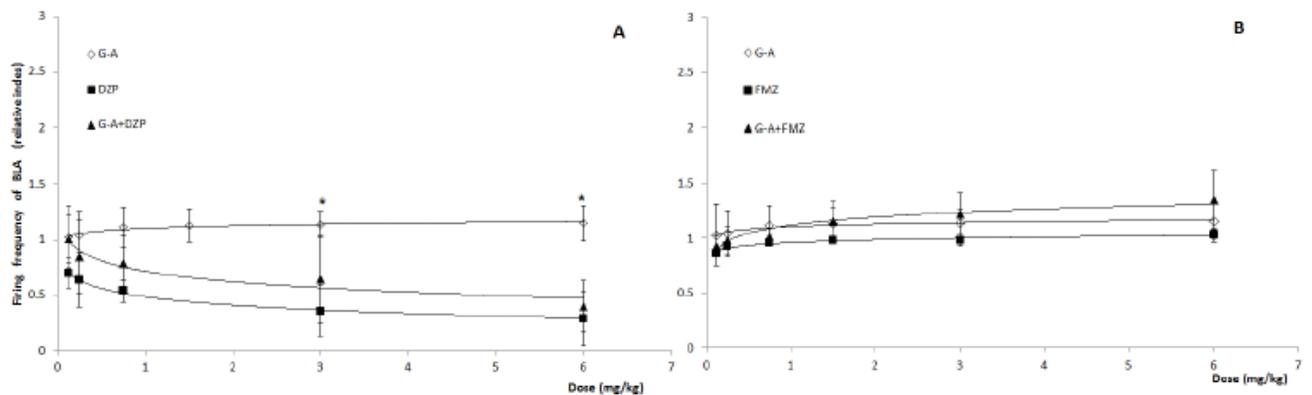


Fig. 3: Effect produced by the co-administration of Galphimine-A (G-A) plus Diazepam (DZP) or Flumazenil (FMZ) on the relativized index of BLA bursting. (A) DZP cumulative doses (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 10 mg/kg). Co-administration of G-A (0.125 mg/kg) plus DZP (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 10 mg/kg). (B) FMZ cumulative doses (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Co-administration of G-A (0.125 mg/kg) plus FMZ (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, and 6 mg/kg). Student *t* test, * $P < 0.05$

In panel A of Figure 4, the neuronal firing rate of BLA by administration of PTX (non-competitive GABA-A receptor antagonist) is shown. An increase of firing rate is observed, which is not significantly different from that of animals that received G-A alone. However, co-administration of G-A+PTX produced a significant increase in firing rate, but only at the highest doses ($p < 0.05$). This result produced by G-A, of modifying the effect produced by PTX, was also observed in the EPM test, in which the combination of G-A and PTX was able to increase significantly the %TOA and %EOA.

Panel B of the same figure illustrates that administration of increasing doses of PTZ did not modify the frequency of neuronal firing and although the co-administration of G-A with PTX provoked a decrement of firing frequency, there was not a significantly difference ($p > 0.05$).

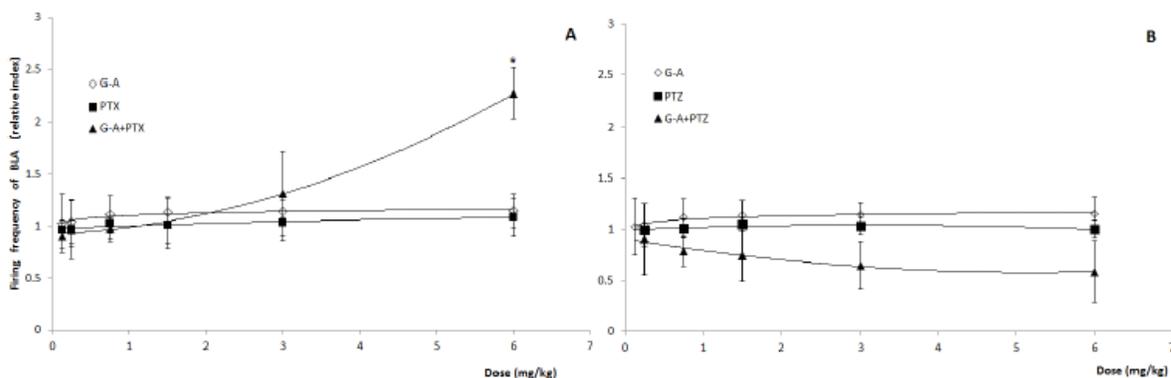


Fig. 4: Effect produced by co-administration of Galphimine-A (G-A) plus picrotoxin (PTX) or pentylentetrazole (PTZ) on the relativized index of BLA bursting. (A) PTX cumulative doses (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). Co-administration of G-A (0.125 mg/kg) plus PTX (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg). (B) PTZ cumulative doses (0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, and 15 mg/kg). Co-administration of G-A (0.125 mg/kg) plus PTZ (0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15 mg/kg). Student *t* test. * $P < 0.05$

Panel A of Figure 5 shows that BCC (a competitive antagonist of GABA receptors) did not modify the frequency of neuronal firing, while the co-administration of G-A + BCC significantly increased this parameter in a dose-dependent manner. Moreover, these curve values were also higher than those of the effect of G-A when it was administered alone ($p < 0.005$).

Phaclofen (PHC, an antagonist of the GABA-B receptor) induced a significant increase of firing rate in the BLA in a dose-dependent manner. This effect could be considered similar to that produced by G-A, however when both substances were co-administered (G-A+PHC), this produced a consistent and dose dependent diminution of the firing rate (Panel B Figure 5).

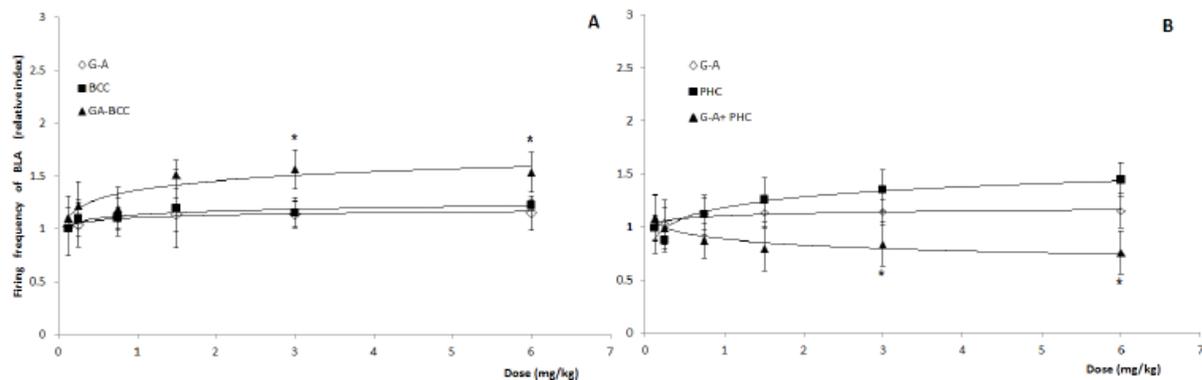


Fig. 5: Effect produced by the co-administration of Galphimine-A (G-A, ◇) plus bicuculline (BCC) or phaclofen (PHC) under the relativized index of BLA bursting. (A) Cumulative increasing doses of BCC (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, and 6 mg/kg, ■). Co-administration of G-A (0.125 mg/kg) plus increasing doses of BCC (▲). (B) Cumulative increasing doses of PHC (0.125, 0.25, 0.75, 1.5, 3, and 6 mg/kg, ■). Co-administration of G-A (0.125 mg/kg) plus increasing doses of PHC (▲). Student *t* test. **P* < 0.05.

Data presented here suggest that the effect produced by G-A in BLA neurons is different of that of DZP, and does not interact directly with GABAergic system. The possible interaction between G-A and PTX, that it was observed in the present work, probably do not involve the GABAergic system. It is well known that PTX is also able to inhibit the Cl⁻ influx in Glycine and Glu receptors; as well as to block receptors that are Cation selective, as it is the case of the 5-HT_{3A} (Das *et al.*, 2003). PTX is also able to antagonize the excitatory effect of DOI (an agonist of the 5-HT_{2A/2C} receptor) in BLA (Sun *et al.*, 2013) in which, the activation produces anxiolytic effect. With these facts, and due to the structural similarity between G-A and G-B (the other anxiolytic triterpene isolated from *G. glauca*, that has shown an interaction with the serotonergic system in hippocampus), it is possible to suggest that the *in vivo* anxiolytic activity of G-A could involve the interaction with other neurotransmission system as could be the serotonergic.

CONCLUSIONS

It was demonstrated that the oral administration of the triterpene G-A, isolated from the medicinal plant species *Galphimia glauca*, possesses a dose dependent anxiolytic effect, which does not produce an associated sedative effect. Also, it was observed that G-A did not interact with PTZ and BICC in the EPM, although it is interacting with PTX. Results obtained from electrophysiological recordings showed that the effect produced by G-A is different to that of DZP and suggest that G-A do not interact directly with the GABAergic system, while it was able to modify the effect produced by PTX, BCC and PHC evidencing a different action mechanism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by financing from the Coordination of Research in Health of the Mexican Institute of Social Security (FIS/IMSS/PROT/G11/928) and from CONACyT-México (CB-2012-01-181180). We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the grant (206839) for the Doctoral studies of Dante Avilés-Montes at the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Iztapalapa. Thanks are also given to the Mexican Institute of Social Security (IMSS) for the grant awarded (99183985) for the Doctoral studies of Dante Avilés-Montes.

REFERENCES

- Aitkenhead, A.R., D.J. Rowbotham and S. Graham, 2001. Sedative and anticonvulsant drugs. In: Textbook of anaesthesia, A. R. Aitkenhead, D. J. Rowbotham and S. Graham, (Eds.). Ed. Churchill Livingstone, New York, U.S.A.: pp: 192-200.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*, 21(2): 205-235. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000334727380065X>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80065-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80065-X).
- Bousoño, M.A., C.; Bascarón, M. T.; Bobes, J., , 2009. Fármacos ansiolíticos e hipnóticos. In: Farmacología básica y clínica, P. M. Lorenzo, A.; Lizasoain, I.; Leza, J. C.; Moro, M. A.; Portolés, A., (Ed.). Editorial Médica Panamericana, S. A., Madrid, España: pp: 275-290.
- Cannistraro, P.R., S., , 2003. Neural circuitry of anxiety: Evidence from structural and functional neuroimaging studies. *Psychopharmacology Bulletin*, 37(4): 8-25.
- Cavallini, M. and L. Bellodi, 2001. Genetics of anxiety disorders: Part i. In: Anxiety Disorders. An Introduction to Clinical Management and Research, E. J. L. Griez, C. Faravelli, D. Nutt and J. Zohar (Eds.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK: pp: 25-40.
- Clement, Y. and G. Chapouthier, 1998. Biological bases of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(5): 623-633. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763497000584>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00058-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00058-4).
- Clénet, F., M. Hascoët, G. Fillion, H. Galons and M. Bourin, 2005. Role of gaba-ergic and serotonergic systems in the anxiolytic-like mechanism of action of a 5-HT_{1A} modulator antagonist in the mouse elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 158(2): 339-348. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432804003742>. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2004.09.015>.
- Choleris, E., A.W. Thomas, M. Kavaliers and F.S. Prato, 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3): 235-260. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763401000112>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2).

- Das, P., C.L. Bell-Horner, T.K. Machu and G.H. Dillon, 2003. The gaba_a receptor antagonist picrotoxin inhibits 5-hydroxytryptamine type 3_a receptors. *Neuropharmacology*, 44(4): 431-438. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390803000327>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00032-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00032-7).
- Davis, M., 1998. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biological Psychiatry*, 44(12): 1239-1247. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322398002881>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00288-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00288-1).
- Davis, M., D. Rainnie and M. Cassell, 1994. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 17(5): 208-214. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166223694901066>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90106-6](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(94)90106-6).
- Gaudreau, H. and D. Pare, 1996. Projection neurons of the lateral amygdaloid nucleus are virtually silent throughout the sleep--waking cycle.
- González-Cortazar, M., J. Tortoriello and L. Alvarez, 2005. Norsesofriedelanes as spasmolytics, advances of structure-activity relationships. *Planta Med*, 71(08): 711-716. DOI 10.1055/s-2005-871224.
- Herrera-Arellano, A., E. Jiménez-Ferrer, A. Zamilpa, M. Morales-Valdéz, C.E. García-Valencia and J. Tortoriello, 2007. Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Planta Med*, 73(08): 713-717. DOI 10.1055/s-2007-981539.
- Herrera-Arellano, A., J.E. Jiménez-Ferrer, A. Zamilpa, G. García-Alonso, S. Herrera-Alvarez and J. Tortoriello, 2012. Therapeutic effectiveness of *galphimia glauca* vs. Lorazepam in generalized anxiety disorder. A controlled 15-week clinical trial. *Planta Med*, 78(14): 1529-1535. DOI 10.1055/s-0032-1315110.
- Herrera-Ruiz, M., M. González-Cortazar, E. Jiménez-Ferrer, A. Zamilpa, L. Álvarez, G. Ramírez and J. Tortoriello, 2006. Anxiolytic effect of natural galphimines from *galphimia glauca* and their chemical derivatives. *Journal of Natural Products*, 69(1): 59-61. Available from <http://dx.doi.org/10.1021/np050305x> [Accessed 2014/04/17]. DOI 10.1021/np050305x.
- Herrera-Ruiz, M., J.E. Jiménez-Ferrer, T.C.M. De Lima, D. Avilés-Montes, D. Pérez-García, M. González-Cortazar and J. Tortoriello, 2006. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *galphimia glauca*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 13(1): 23-28. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711305001285?showall=true>.
- Hodges, H., S. Green and B. Glenn, 1987. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology*, 92(4): 491-504. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/BF00176484>. DOI 10.1007/BF00176484.
- Jiménez-Ferrer, E., M. Herrera-Ruiz, R. Ramírez-García, A. Herrera-Arellano and J. Tortoriello, 2011. Interaction of the natural anxiolytic galphimine-b with serotonergic drugs on dorsal hippocampus in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1): 724-729. Available from

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111004466>. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.029>.
- Klodzinska, A., E. Tatarczyńska, E. Chojnacka-Wójcik, G. Nowak, N.D.P. Cosford and A. Pilc, 2004. Anxiolytic-like effects of mtep, a potent and selective mglu5 receptor agonist does not involve gabaa signaling. *Neuropharmacology*, 47(3): 342-350. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390804001121>. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.013>.
- LeDoux, J., 2003. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol*, 23(4-5): 727-738. Available from <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1025048802629>. DOI 10.1023/A:1025048802629.
- Lister, R., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2): 180-185. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/BF00177912>. DOI 10.1007/bf00177912.
- McDonald, A.J., 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3): 257-332. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008298000033>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00003-3).
- Pape, H.-C. and D. Pare, 2010. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews* 90(2): 419-463. Available from <http://physrev.physiology.org/physrev/90/2/419.full.pdf>. DOI 10.1152/physrev.00037.2009.
- Paré, D. and D.R. Collins, 2000. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: Multiple extracellular recordings in conscious cats. *The Journal of Neuroscience*, 20(7): 2701-2710. Available from <http://www.jneurosci.org/content/20/7/2701.abstract>.
- Paxinos, G. and C. Watson, 1986 *The rat brain in stereotaxic coordinates*. . London Academic Press.
- Pellow, S., P. Chopin, S.E. File and M. Briley, 1985. Validation of open : Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3): 149-167. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165027085900317>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7).
- Pellow, S. and S.E. File, 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(3): 525-529. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305786905526>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6).
- Prieto-Gómez, B., J. Tortoriello, A. Vázquez-Alvarez and C. Reyes-Vázquez, 2003. Galphimine b modulates synaptic transmission on dopaminergic ventral tegmental area neurons. *Planta Med*, 69(01): 38-43. DOI 10.1055/s-2003-37043.
- Siemiątkowski, M., H. Sienkiewicz-Jarosz, A.I. Członkowska, A. Bidziński and A. Płaźnik, 2000. Effects of buspirone, diazepam, and zolpidem on open field behavior, and brain [3h]muscimol binding after buspirone pretreatment.

- Pharmacology Biochemistry and Behavior, 66(3): 645-651. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305700002008>. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00200-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00200-8).
- Stankevicius, D., E.C. Rodrigues-Costa, J. Camilo Flório and J. Palermo-Neto, 2008. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. *Neuropharmacology*, 54(2): 300-308. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390807003176>. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.09.011>.
- Sun, Y.-N., L.-B. Li, Q.-J. Zhang, Y.-P. Hui, Y. Wang, L. Zhang, L. Chen, L.-N. Han, Y. Guo and J. Liu, 2013. The response of juxtacellular labeled gaba interneurons in the basolateral amygdaloid nucleus anterior part to 5-ht_{2a/2c} receptor activation is decreased in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuropharmacology*, 73(0): 404-414. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081300289X>. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.021>.
- Tortoriello, J. and A. Ortega, 1993. Sedative effect of galphimine b, a nor- seco - triterpenoid from galphimia glauca. *Planta Med*, 59(05): 398-400. DOI 10.1055/s-2006-959717.
- Tortoriello, J., A. Ortega, M. Herrera-Ruíz, J. Trujillo and C. Reyes-Vázquez, 1998. Galphimine-b modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats. *Planta Med*, 64(04): 309-313. DOI 10.1055/s-2006-957440.
- Vissiennon, C., K. Nieber, O. Kelber and V. Butterweck, Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin — are they prodrugs? *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(7): 733-740. Available from [http://www.jnutbio.com/article/S0955-2863\(11\)00114-8/abstract](http://www.jnutbio.com/article/S0955-2863(11)00114-8/abstract) [Accessed 2015/01/23]. DOI 10.1016/j.jnutbio.2011.03.017.
- Zhang, Z.-J., 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences*, 75(14): 1659-1699. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320504004849>. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.014>.