

SISTEMA DE BIBLIOTECAS
Instituto de Investigación de Zonas
Desérticas. UASLP



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE MEDICINA

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR
EL EFECTO ANSIOLÍTICO DE *Casimiroa pringlei* EN
UN MODELO ANIMAL**

Tesis que presenta
Norma Alicia Landaverde Hernández.

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS BÁSICAS.

Dirección de tesis
Dra. María Esther Jiménez Cataño.

Becario CONACYT 182626

Octubre del 2005.

EX LIBRIS



SISTEMA DE
BIBLIOTECAS

U.A.S.L.P. 1127
Nº DE REG. 111

Trabajo realizado en:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UASLP.
Laboratorio de Fotoquímica, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas,
UASLP.

Dirección de Tesis

Dra. María Esther Jiménez Cataño.

Comité tutelar

Dra. María Deogracias Ortiz Pérez.
Dra. Bertha Irene Juárez Flores.

SISTEMA DE BIBLIOTECAS
Instituto de Investigación de Zonas
Desérticas, UASLP

- ◆ A Dios por haberme dado la fortaleza para cumplir con esta valiosa oportunidad.
- ◆ A mis padres Leobardo Landaverde González y Alicia Hernández Sifuentes, a mis hermanas Juanis, Lupita y Karlita, por haber dedicado gran parte de su tiempo pensando y procurando mi bienestar.
- ◆ A mi tía Tiva por haber sido uno de mis pilares durante este tiempo.
- ◆ A mi padrino Marcos por su apoyo incondicional.
- ◆ A mi tía Ofelia, tío Florencio y Edith por su afecto y todas sus atenciones.
- ◆ Dra. María Esther Jiménez Cataño por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.
- ◆ Dra. María Deogracias Ortiz, por sus valiosas recomendaciones y aportaciones a este trabajo.
- ◆ Dra. Bertha Irene Juárez Flores y QFB. María de la Luz Martínez Rivera por su valiosa amistad, sus consejos y exhortaciones para seguir adelante.
- ◆ A mis invaluable compañeros de la Facultad y amigos excepcionales: *Arelí*, *Fátima*, *Imelda*, *Juan Manuel*, *Lilia*, *Liliana*, *Marcos*, *Marthita*, *Melissa*, *Nadia*, *Paulina*, *Ramón*, *Rafael* y *Sergio* por su compañía que tantas veces se tradujo en alegría y momentos inolvidables.
- ◆ A CONACYT por el apoyo económico que me otorgó durante estos dos años, y sin el cual no hubiera sido posible culminar esta etapa.

"Los curiosos de espíritu aprenderán, y sólo los resueltos vencerán las dificultades del aprendizaje. El coeficiente de curiosidad siempre me ha fascinado mucho más que el coeficiente de inteligencia"

Eugene S. Wilson.

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR EL EFECTO ANSIOLÍTICO DE *Casimiroa pringlei* EN UN MODELO ANIMAL

Landaverde NA¹, Jiménez ME¹, Ortiz MD¹, Juárez BI^{2*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

² Laboratorio de Fitoquímica, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

* Autor Correspondiente

Laboratorio de Fitoquímica, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas,
UASLP.

Altair 200

Col. del Llano

78377 San Luis Potosí S.L.P. México

Teléfono: 822 21 30 y 822 27 18

Fax: 822 45 34

e-mail: berthajf@uaslp.mx

RESUMEN

En este estudio se examinaron los posibles efectos ansiolítico y sedante por la administración oral del aceite esencial de *Casimiroa pringlei* (AECp) en ratas macho, mediante las siguientes pruebas de conducta: laberinto elevado, campo abierto, placa perforada y prueba de Irwin. El aceite fue extraído por destilación con arrastre de vapor a partir de hojas frescas. Se realizó una prueba de toxicidad aguda en grupos de ratones macho con dosis logarítmicas (316, 500, 795, 1000, 2000, 3000 y 5000 mg/kg de peso) del aceite vegetal para calcular la DL₅₀, obteniendo como resultado 2433 mg/kg de peso. Para estandarizar el efecto ansiolítico o ansiogénico con los fármacos control mediante administración oral, se realizaron las pruebas de laberinto elevado y campo abierto con distintas dosis y periodos de evaluación. El efecto ansiolítico se observó en una hora para bromazepam (0.023mg/kg) y el ansiogénico en dos horas para cafeína (20mg/kg). Cuatro dosis del AECp por debajo de la DL₅₀, fueron evaluadas en estos periodos, hallándose un notable efecto ansiolítico en las dosis de 795 y 1000 mg/kg en una hora, y para 500 mg/kg en dos horas. En la prueba de campo abierto, la actividad para las dosis de 316 y 1000 mg/kg del aceite se halla disminuida significativamente a la hora; mientras que a las dos horas las cuatro dosis administradas produjeron una disminución significativa de la actividad. En la prueba de curiosidad, evaluada mediante la placa perforada se encontró que en una hora el bromazepam (0.023 mg/kg) y el AECp (795 mg/kg) tienen un efecto ansiolítico similar, contrario al observado con la dosis de 20 mg/kg de cafeína y 1000 mg/kg de AECp. Además se evaluó la dosis de 795 mg/kg de AECp mediante la prueba de Irwin, para verificar sus efectos neurológicos, motores y

sensoriales, hallándose que en una y dos horas sus efectos son iguales a los de una dosis de 0.023 mg/kg de bromazepam y significativamente distintos a los producidos por 20 mg/kg de cafeína. Por lo anterior se propone un efecto ansiolítico del AECp con algunas dosis, con o sin efectos colaterales motores en una hora y además efecto ansiolítico-sedante después de dos horas de su administración.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, se encuentran más de 4000 especies vegetales que se utilizan con fines medicinales. Además, se estima que 90% de la población mexicana usa cotidiana o esporádicamente plantas medicinales para aliviar sus padecimientos (González S.A., 2003). La caracterización química y farmacológica de los principios activos de estas especies vegetales es una actividad multidisciplinaria que seguramente redundará en gran provecho para nuestro país, como ha sucedido con este tipo de investigación en países desarrollados, sin embargo se trata de una disciplina incipiente en México.

A este respecto, se ha comenzado a estudiar el zapote blanco (*Casimiroa edulis*). Su uso medicinal se remonta a la época prehispánica, en la que ya se conocían los efectos somníferos de su fruta y, posteriormente, durante la época colonial se inició el uso de té a partir de hojas y corteza que tenían el mismo efecto (Lozoya X. y Enriquez R., 1981). Recientemente, se comprobó su actividad hipotensiva (Magos G.A. *et al.*, 1999), además de sus efectos anticonvulsivos en ensayos biológicos, utilizando extractos hidroetanólicos y acuosos de corteza y hojas (Lozoya X. *et al.*, 1977; Garzón M.P. *et al.*, 1999). Estos últimos han sido popularmente usados como sedantes y para reducir la presión sanguínea, aunque no se han realizado ensayos biológicos usando alguno de los aproximadamente 25 compuestos ya aislados de *C. edulis* (Lozoya X. y Enriquez R., 1981; Navarro R.A. *et al.*, 1995).

La evaluación del efecto ansiolítico de plantas del género *Casimiroa* puede ser útil para encontrar compuestos alternativos más seguros para tratar la ansiedad y otros trastornos de la conducta, ya que los fármacos disponibles no están libres de efectos colaterales indeseables como son la tolerancia y la dependencia, además de que entre el 25 y el 30 % de los pacientes no responden a las drogas más frecuentemente prescritas contra la ansiedad, como son las benzodiazepinas (Akhondzadh S. *et al.*, 2001).

A pesar de la dificultad que representa trasladar los resultados de la investigación etnofarmacológica en un laboratorio a la aplicación clínica, existe una amplia serie de extractos vegetales que ya han sido caracterizados neuroquímicamente *in vitro*, e inclusive *in vivo*, aunque con frecuencia la vía de administración utilizada para su estudio en animales difiere de la empleada tradicionalmente para humanos. Entre los productos vegetales con efectos importantes sobre el SNC se encuentran *Matricaria recutita* (manzanilla), *Passiflora incarnata* (pasiflora), *Kava*, y *Valeriana officinalis* (valeriana), las cuales tiene efecto somnífero, ansiolítico y anticonvulsivo por su interacción con el sistema GABAérgico (Parra V.A. *et al.*, 2002; Wasowski H. V. *et al.*, 1995; Zanolli P. *et al.*, 2000); *Hypericum perforatum* (hierba de San Juan) y *Gingo biloba*, utilizadas para el tratamiento de la depresión y problemas de memoria, respectivamente, por sus efectos a nivel de las aminas biogénicas y en la transmisión colinérgica (Müller W.E. *et al.*, 1998; Johns C.M., 1999; Beaubrun G.M. y Gray G.E., 2000). El impacto que ha tenido el uso de estos extractos va en

aumento y existe un gran interés por caracterizar otras plantas con efectos benéficos sobre el SNC.

Además de la *edulis*, existen otras especies que pertenecen al género *Casimiroa* como son: *emarginata*, *tetrameria*, *watsoni*, *pubescens*, *pringlei*, *edulis* y *sapota*. Solo existían estudios de *C. edulis* aun cuando *C. pringlei*, ha sido popularmente utilizada en infusiones y maceraciones para baños corporales, y se le han atribuido propiedades ansiolíticas y somníferas, características que ya han sido verificadas en algunas otras especies de la familia Rutaceae (Roth C.F.M. y Costa M., 2002) a la que pertenece el genero *Casimiroa*. *C. pringlei* se distribuye ampliamente en los estados de Nuevo León, San Luis Potosí y Durango (Standley P.C., 1982), puede alcanzar 3 a 4 metros de altura, sus hojas son trifoliadas de borde liso, tallos grisáceos, frutos solitarios, ovals-acuminados de 2.5 cm de largo por 1.5 cm de ancho aproximadamente, de color amarillento, con una semilla o raramente dos (Lozoya X., y Enriquez R., 1981). Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar por administración oral, los efectos de conducta del aceite esencial de *C. pringlei* (AECp) en ratas, con el fin de determinar si tiene propiedades ansiolíticas. Debido a que la mayoría de las investigaciones de efectos de extractos vegetales sobre el SNC se han hecho empleando administración intraperitoneal, la primera fase de este estudio fue la elaboración de curvas de referencia para la administración oral de compuestos con probada actividad ansiogénica y ansiolítica, lo cual permitió establecer comparaciones utilizando una vía de administración similar a la utilizada por el humano.

METODOLOGÍA

1.- Animales

Se utilizaron ratones macho adultos (30 - 40 g), cepa Balb C y ratas macho adultas (300 – 400 g) cepa Wistar. Fueron alojados en una habitación adecuadamente ventilada, con temperatura promedio de 28 °C, acceso libre a agua y alimento, en grupos de tres animales por caja. Se utilizó un ciclo de luz invertido (oscuridad de 7 AM a 7 PM) a fin de realizar las pruebas de conducta durante la fase activa de los animales. Todos los experimentos se realizaron en el cuarto oscuro donde se alojaba a los animales (dimensiones 3 m x 3 m), entre las 9 AM y las 4 PM.

2.- Recolección de la planta

Se procesaron aproximadamente 80 kg de hojas de *C. pringlei* (Wats Engler) obtenidas de 4 recolectas en la comunidad del Aguaje de los García municipio de Guadalcázar S. L. P. durante los meses de julio a diciembre del año 2004. La planta fue autenticada por el taxónomo José García del Herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas y un ejemplar fue depositado y registrado como referencia. Inmediatamente después de su recolección, las hojas fueron separadas y almacenadas a 4 °C en bolsas de polietileno oscuro, hasta el momento de su utilización.

3.- Extracción del aceite esencial

El aceite esencial se obtuvo por destilación en corriente de vapor de agua de las hojas trituradas (4 litros de agua potable/500 gramos de hoja), seguido de

una extracción líquido- líquido usando una proporción 6.66:1 destilado:éter etílico, mismo que se concentró a presión reducida en un rotavapor (R-Büchi R-124, Suiza). El aceite esencial se deshidrató con sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4°C protegido de la luz y aire (Moretti M.D. et al., 2002). El rendimiento fue de aproximadamente 0.4 ml de aceite esencial / kg de hoja.

4.- Fármacos

Las dosis administradas de cafeína (MERCK®, Darmstadt) fueron 10, 20, 40 y 80 mg/kg en volúmenes variables a partir de una solución de benzoato de cafeína, las cuales han sido caracterizadas como ansiogénicas en investigaciones previas (Baldwin H.A. *et al.*, 1989; Bhattacharya S.K. *et al.*, 1997; Jones N. *et al.*, 2002). El bromazepam (LEXOTAN®, Roche, México) fue administrado con base en las dosis terapéuticas recomendadas por la bibliografía en el tratamiento de ansiedad: 0.023, 0.049 y 0.0092 mg/kg (López V.F.J. *et al.*, 2004). En ambos casos se utilizó agua embotellada como vehículo y los tratamientos fueron administrados mediante una cánula esofágica. Se realizaron pruebas piloto utilizando aceite de maíz y de ajonjolí como vehículos para administrar el AECp, pero se encontraron efectos de interferencia y/o enmascarantes, ya que estos aceites producen por sí mismos, cambios en la conducta de los animales de experimentación. Por lo tanto, el aceite esencial fue administrado sin vehículo en las pruebas de conducta.

5.- Prueba de toxicidad aguda

El AEC_p se administró a ratones por medio de una cánula esofágica en dosis logarítmicas crecientes de 316, 500, 795, 1000, 2000, 3000 y 5000 mg/ kg de peso usando aceite de maíz (MAZOLA) como vehículo (n=3). Los animales fueron sometidos a observación a los 30 minutos, una, dos, tres y cuatro horas posteriores al tratamiento, y periódicamente durante las 24 horas siguientes, (Guideline for Testing of Chemicals, OECD., 2000).

6.- Estandarización de prueba de efectos ansiolíticos y ansiogénicos

Las pruebas siguientes fueron valoradas a ciego, es decir, el evaluador desconocía el tratamiento que le había sido administrado al animal de experimentación.

6.1 Laberinto elevado

Con el fin de estandarizar la administración oral de cada uno de los fármacos control utilizados en estas prueba, cafeína (ansiogénico) y bromazepam (ansiolítico), éstos fueron evaluados en cuatro periodos: 30, 60, 120, y 180 minutos después de su administración, usando el mismo grupo (7 animales) en dos periodos de evaluación para una misma dosis, de tal modo que cada unidad experimental quedó expuesta únicamente en dos ocasiones a cada dispositivo. El grupo control fue tratado con agua embotellada purificada. La prueba del laberinto elevado fue utilizada para determinar el efecto ansiolítico o ansiogénico relacionados a conducta mediado por la amígdala (Yilmazer-Hande A.M. *et al*, 2003). El laberinto elevado consiste de dos brazos abiertos (60 x 10 cm.) y dos

brazos cerrados (60 x 10 x 24 cm.), con disposición perpendicular entre los dos brazos abiertos y los dos cerrados, fabricado en acrílico y colocado 65 cm por encima de un fondo oscuro. De los tratamientos que se someten a evaluación, los compuestos ansiolíticos reducen la aversión natural del animal a permanecer en los brazos abiertos y promueven su exploración, por el contrario los ansiogénicos, aumentan el tiempo de permanencia en los brazos cerrados. Por lo tanto un incremento en el tiempo que el animal permanezca en los brazos abiertos fue considerado como un reflejo de los efectos ansiolíticos, en comparación con el grupo control (Pellow S. *et al.*, 1985; Kalueff A.V. y Tuohimaa P., 2004). Después de la administración del fármaco, los animales fueron colocados en el centro del laberinto, de frente indistintamente a cualquiera de los brazos, y observados durante 5 min., los parámetros valorados fueron: número de entradas, así como tiempo de permanencia acumulada (segundos), tanto en los brazos cerrados como en los brazos abiertos.

6.2 Prueba a campo abierto

Inmediatamente después de la prueba en laberinto elevado, los animales fueron observados durante 5 minutos en un campo abierto. Esta prueba se utilizó para evaluar la actividad motora del animal de experimentación, y además permitió determinar si la permanencia de los animales en los brazos cerrados del dispositivo anterior, obedecía a un efecto ansiogénico o simplemente a que los animales habían disminuido su actividad locomotora y no se movían de un solo lugar. El área de campo abierto se elaboró con unicel, 1m x 1m, con paredes de 35 cm. de altura. El piso se dividió en cinco cuadros a lo largo de cada pared, y 9

cuadros centrales de 20 cm cada uno (Roth C.F.M. y Costa M., 2002; Molina H.M. *et al.*, 2004). Los parámetros evaluados fueron los siguientes: número de cuadros cruzados, desplazamiento vertical y acicalamiento, tanto en la periferia como en el centro.

7.- Tabla perforada

Esta prueba fue introducida por Boissier y Simon, y ofrece un método sencillo para valorar la respuesta del animal a un medio que no le es familiar. Es usada para detectar emoción, ansiedad y/o respuesta del animal a una situación de estrés. El aparato de exploración fue construido de unicel, con dimensiones de 72 x 72 cm, y paredes de 28 cm de altura. El piso se dividió en 16 cuadros, cada cuadro contiene una perforación de 4 cm de diámetro y 3 cm de profundidad, en cada uno de ellos se colocó una croqueta de alimento como incentivo para la exploración. La rata fue colocada en el centro del piso, y observada durante 5 minutos, tiempo durante el cual se valoraron los siguientes parámetros: acicalamientos, desplazamiento vertical, número de cuadros cruzados (con las cuatro patas), número de husmeos en las perforaciones (cuando ambos ojos desaparecen dentro del hoyo), duración acumulada de los husmeos (segundos) (Takeda H. *et al.*, 1998). Los tratamientos administrados fueron bromazepam (0.023 mg/kg), cafeína (20 mg/kg) y AECp (795 y 1000 mg/kg). Los animales fueron evaluados antes de la administración, una y dos horas después.

8.- Prueba de Irwin

El esquema de Irwin ocupa un lugar muy importante en la detección de posibles acciones sobre el SNC por la diversidad y calidad de la información. Es una prueba semicuantitativa preliminar muy importante en la búsqueda de nuevos fármacos. Cada animal fue observado durante 15 minutos y los valores de reacción se asignaron de acuerdo con el siguiente parámetro: cuando la normalidad era la ausencia de reacción se indicó con un cero y la evaluación del efecto del fármaco o producto estudiado fue de 1 a 8; cuando la normalidad fue una respuesta se le asignó un valor de 4, se indicó con valores de 0-3 si el fármaco o material ocasionó una disminución de la reacción y con valores de 5-8 si provocó un aumento en la misma (Moreno L.R., 2000). Las pruebas se realizaron siempre entre las 9:00 y las 16:00 horas; las observaciones se realizaron 0.5, 1, 2, 6, y 24 horas después de la administración de los tratamientos. Se comparó el efecto del AECp (dosis 795 mg/kg) frente a dos tratamientos: cafeína (10 mg/kg estimulante) y bromazepam (0.023 mg/kg, ansiolítico), la administración fue vía oral mediante una cánula esofágica y n=7. Se examinaron los siguientes parámetros:

8.1 Evaluación neurológica

- a. Temblor (0)
- b. Convulsiones (0): pueden proceder de descargas intensas o anormales de origen cerebral.
- c. Exoftalmos (0)
- d. Piloerección (0)

- e. Estado de alerta (4)
- f. Esterotipia (0): consiste en repetición mecánica de movimientos como andar atrás, morderse, girar, etc.

8.2 Evaluación sensorial

- a. Sobresalto al ruido (4): es la respuesta ante un sonido seco, como el de las palmas de las manos.
- b. Reflejo ipsolateral flexor (4): se pinza suavemente un dedo de la pata posterior y se observa si el animal la retira.
- c. Reflejo corneal (4): se toca la córnea con un objeto fino y suave, y se observa el cierre de los párpados.
- d. Reflejo conducto auditivo (4): se introduce en el pabellón auditivo un objeto fino y suave y se observa si el animal la retira, o agita vigorosamente la oreja.
- e. Estímulo sobre el cuerpo: se trata de tocar de manera abrupta el cuerpo de la rata y tocar con estímulo afilado. Se aplica un estímulo momentáneo (presión) en tres superficies de cada lado del cuerpo de la rata: costillas, articulaciones superiores de patas traseras y delanteras y se registra la orientación del animal a la presión.

8.3 Evaluación motora

- a. Fuerza presora (4): se determina colocando al animal sobre una varilla horizontal y viendo si cae o, por el contrario, se agarra e incluso se desplaza por ella.

b. Reflejo de enderezamiento (0): se determina tomando al animal de la cola y dándole una pequeña voltereta en el aire. Se observa cómo cae sobre la superficie plana (y próxima) y se repitió cinco veces el experimento. Se calificó de la siguiente manera:

de lado:

1-2 veces = 1

3-4 veces = 2

5 veces = 3

de dorso:

1-2 veces = 4

3-4 veces = 5

5 veces = 6

enderezamiento lento = 7

no enderezamiento = 8

c. Incoordinación en la marcha (0)

d. Tono muscular (4): se toma al animal de la pata trasera y se observa la resistencia a la extensión de la misma (Irwin S., 1962; Moreno L.R., 2000).

8.4 Evaluación motora complementaria

Con el fin de complementar la prueba de Irwin, se anexaron pruebas semicuantitativas realizados en estudios previos de nuestro laboratorio (Castillo C.G. *et al.*, 2001).

Evaluación motora

- a. Postura general (0): se colocó a la rata sobre una mesa y se observó la postura que ésta tomaba durante un minuto. Se evaluó como 1 tanto cuando el animal mantuvo la mandíbula sobre la superficie de la mesa y cuando presentaba un arco exagerado en la espalda.
- b. Orientación extremidades: se valoraron ambas extremidades (posteriores y anteriores) bajo el siguiente criterio.

Extremidades anteriores:

- 0 patas anteriores estiradas hacia delante (normal)
- 1 patas desviadas hacia atrás más de 45°
- 2 patas desviadas más de 90°
- 3 desviación de más de 135°
- 4 patas anteriores juntas al cuerpo
- 5 colocación de extremidades

Extremidades posteriores:

- 0 orientación afuera normal
- 1 desviación de 15° de la orientación normal
- 2 desviación de 30° de la orientación normal
- 3 desviación de 45° de la orientación normal
- 4 extremidades juntas al cuerpo (Castillo C.G. *et al.*, 2001).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como resultado de las pruebas efectuadas en este estudio, se obtuvieron datos discretos y continuos. Los datos continuos se expresaron como promedio \pm la desviación estándar, mientras que para los discretos se utilizó la mediana \pm los límites de confianza al 95%. En el caso del laberinto elevado, se señalan las diferencias en el tiempo de permanencia (segundos) en los brazos (cerrados menos abiertos), es decir, un ansiolítico hará esta diferencia pequeña con respecto al control, contrario a los resultados que se esperan con un ansiogénico. Tanto para esta prueba como para la del campo abierto, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, además de la evaluación de sesgo y kurtosis, utilizando la transformación de logaritmo natural en los casos en que la distribución de dichos datos no fuera normal. Para cada tiempo (30, 60, 120 y 180 minutos) se compararon los resultados por medio de ANOVA seguido por la prueba de Tukey. Para esta prueba fueron considerados significativamente diferentes aquellas comparaciones que arrojaran valores de P menores a 0.05. En la prueba de Irwin se obtuvieron datos discretos los cuales fueron comparados por medio de Kruskal Wallis, seguido por una U de Mann-Whitney. Un valor de P menor a 0.025 fue considerado de significancia estadística, ya que la comparación por medio de la U de Mann-Whitney se efectuó dos veces, al compararse los efectos del aceite esencial una vez contra el bromazepan y otra contra la cafeína.

RESULTADOS

Prueba de toxicidad aguda

De acuerdo con los resultados obtenidos, la dosis de 5000, 3000 y 2000 mg/kg tienen efecto nocivo sobre el sistema motor del animal ya que entorpecen su movimiento y además lo deprimen, hasta causar su muerte. La DL_{50} fue de 2433 mg/kg, calculada con base al método Litchfield y Wilcoxon (Litchfield J.T. y Wilcoxon F.J., 1949), por lo que de acuerdo a las categorías de DL_{50} el AEC ρ resulta ser moderadamente tóxico (Franck C.L., 1992).

Las dosis de 1000, 795, 500, y 316 mg/kg únicamente producen respuestas de quietud, pasividad y somnolencia en los animales con respecto a los controles a los que les fue administrado aceite de maíz. Además estas dosis no producen problemas respiratorios o motores (Figura 1).

I. Estandarización oral de los fármacos de referencia

- **Laberinto elevado**

Cafeína

Mientras que a 30 y 60 minutos no hubo diferencias en el tiempo de permanencia entre la administración de cafeína y el control, la permanencia en los brazos cerrados aumenta significativamente en el minuto 120 para las dosis de 20 (209 ± 49.6 s), 40 (218.9 ± 100 s) y 80 mg/kg (227.1 ± 88.4 s) con respecto al control (90.1 ± 44.7 s) En el minuto 180, el tiempo de permanencia en los brazos cerrados para las cuatro dosis de cafeína es mayor significativamente con respecto al control (control = 89.4 ± 57.9 s; 10 mg/kg = 181 ± 46.5 s; 20 mg/kg = 188.8 ± 18.6 s; 40 mg/kg = 200.1 ± 62.9 s; 80 mg/kg = 182.4 ± 30.7 s) (Figura 2a).

Bromazepam

Durante el primer periodo de evaluación realizado a los 30 minutos no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las dosis administradas y el control. En el minuto 60 las dosis de 0.023 (-10.2 ± 49.4 s) y 0.042 mg/kg (27.0 ± 26.3 s) producen un aumento significativo en la permanencia en los brazos abiertos con respecto al control (97.7 ± 70.5 s) (Figura 2 c). El resultado anterior se conserva aún en el minuto 120 para la dosis de 0.023 mg/kg (-10.2 ± 49.4 s) y se alcanza con 0.042 mg/kg (27 ± 26.3 s), frente al control (97.7 ± 70.5 s). Durante la última observación, hecha en el minuto 180, la permanencia en los brazos cerrados, de los animales tratados con bromazepam (0.023 mg/kg = 198.9 ± 17.5 s; 0.049 mg/kg = 201 ± 58.6 s; 0.092 mg/kg = 187.7 ± 45.1 s) es significativamente mayor que la de los controles (89.4 ± 57.9 s).

- **Prueba a campo abierto**

Cafeína

En el minuto 30 se registró un incremento significativo en el número de cuadros cruzados para la dosis de 20 mg/kg (96.1 ± 29.8) con respecto al control (53 ± 20.6), en el minuto 60 no se observan diferencias significativas entre los animales tratados y el grupo control. En contraste, en el minuto 120 la actividad se halla significativamente disminuida para la dosis de 40 (30.5 ± 17.3) y 80 mg/kg (31.9 ± 17.1); mientras que las dosis de 10 (62.3 ± 2.5) y 20 mg/kg (49.9 ± 22.4) siguen un patrón igual al del control (61.3 ± 7.6) (Figura 2 b). En el minuto 180 las dosis de 20 (39.9 ± 27), 40 (46.9 ± 38.1) y 80 mg/kg (25.3 ± 10.1) producen una disminución significativa en la actividad locomotora (70.1 ± 34.5). En la tabla 1 se

resumen los efectos de cada una de las dosis administradas de cafeína. Obsérvese que la dosis de 20 mg/kg ejerce efecto ansiogénico en el minuto 120 sin alteraciones motoras, a diferencia de las dosis de 40 y 80 mg/kg y los resultados en el minuto 180.

Bromazepam

Durante la evaluación en el minuto 30 no se observan cambios significativos entre los animales tratados y el vehículo. La administración de las diferentes dosis de 0.042 mg/kg (33.1 ± 15.2) y 0.092 mg/kg (17 ± 12.5) de bromazepam disminuye la actividad a partir del minuto 60 con respecto al control (68.9 ± 8.6), situación que no se registra con la dosis de 0.023 mg/kg (81.6 ± 12.5) que tiene una actividad muy parecida a la del control (Figura 2 d). Durante la evaluación en el minuto 120 la actividad continúa disminuida para las dosis mayores, y en el minuto 180 se registra un decremento significativo en la actividad para las tres dosis administradas de bromazepam ($0.023 = 10.3 \pm 8.7$; $0.049 = 6.2 \pm 8$; $0.092 = 4.5 \pm 4.3$) con respecto al control (70.1 ± 34.5). Obsérvese el efecto ansiolítico producido por la dosis de 0.023 mg/kg de bromazepam en el minuto 60 sin alteraciones motoras, a diferencia de la dosis de 0.049 mg/kg (Tabla 1).

II. Evaluación del aceite esencial de *C. pringlei*

- **Laberinto elevado**

Habiéndose observado que el efecto ansiogénico y ansiolítico de cafeína y bromazepam, se hallaron en una y dos horas, respectivamente (Tabla 1), las dosis

del AEC_p (316, 500, 795, 1000 mg/kg) fueron evaluadas en estos periodos. Como se mencionó en un principio el aceite fue administrado sin vehículo.

Durante la primera evaluación, una hora después de la administración, las dosis de 1000 y 795 mg/kg incrementaron significativamente la exploración en los brazos abiertos (-34.0 ± 78 s y -86.8 ± 123.9 , respectivamente) con respecto al control (109.5 ± 69.2 s) (Figura 3 a,). Después de dos horas, es la dosis de 500 mg/kg (-50.3 ± 134.2 s) la que produce este efecto (Figura 4 a, Tabla 2).

- **Campo abierto**

La actividad de los animales en el minuto 60 disminuye con las dosis de 316 (30 ± 6.4) y 1000 mg/kg (12 ± 3.9), mientras que las dosis de 500 (66.3 ± 16.3) y 795 mg/kg (79 ± 16) tienen una actividad muy parecida a la del control (68.9 ± 8.6) (Figura 3 b, Tabla 2). Dos horas después de la administración la locomoción de los animales disminuyó significativamente para las cuatro dosis (316 mg/kg= 19 ± 7.3 ; 500 mg/kg= 13.8 ± 7.7 ; 795 mg/kg= 11.8 ± 9.1 ; 1000 mg/kg= 7.8 ± 4.4) con respecto al control (61.3 ± 7.6) (Figura 4 b, Tabla 2).

- **Placa perforada**

La dosis de bromazepam de 0.023 mg/kg incrementa la duración de los husmeos hasta un 272.1% con respecto al basal. Por otra parte, la dosis de 1000 mg/kg del AEC_p es capaz de disminuir el número de husmeos de los animales hasta 39.5% en una hora, en relación a la evaluación previa al tratamiento. La dosis de 716 mg/kg incrementa la duración de los husmeos una hora después del tratamiento hasta 192.7%. En el periodo de dos horas, el tratamiento con cafeína

produce un significativo decremento en la duración de los husmeos (67.2%) en relación a las mediciones basales (Figura 5).

Prueba de Irwin

En la tabla 3 se muestran los principales efectos observados mediante esta prueba después de la administración de 795 mg/kg de AECp. Después de una hora de la administración hay una clara tendencia a la pasividad, similar a la producida por el bromazepam, la cual se mantiene hasta 6 horas posteriores. No se observaron diferencias significativas entre el bromazepam (0.023 mg/kg) y la dosis administrada del AECp en ninguno de los perfiles valorados. Por otra parte, las respuestas producidas por la cafeína (10 mg/kg) en una y dos horas, son significativamente distintas de acuerdo a los parámetros neurológicos, sensoriales y motores incluidos en la prueba. En el perfil motor complementario, los parámetros motores tales como la postura general y la orientación de las extremidades, no se hallan afectados con estos tratamientos, en ninguno de los periodos de evaluación.

DISCUSION

Utilizando paradigmas clásicos para la búsqueda de nuevos fármacos con acción sobre SNC, como ansiolíticos, ansiogénicos, sedantes y para la determinación de algunos de sus efectos colaterales (Schmitt U. y Hiemke C., 1998; Kalueff A.V. y Tuohimaa P., 2004), evaluamos el efecto del AEC ρ . En 4 experimentos diferentes, demostramos que la administración de dosis por debajo de la DL₅₀ del AEC ρ tiene efecto ansiolítico, que puede ir o no acompañado de disminución de la actividad locomotora. Además encontramos que estos efectos no siguen un patrón regular dosis- respuesta, como ha sido previamente señalado para otros extractos vegetales crudos (Roth C.F.M. y Costa M., 2002; Chen S.W. *et al.*, 2004; Sousa F.C.F. *et al.*, 2004).

La mayoría de las investigaciones fitoquímicas presentan algunas limitaciones que dificultan el traslado de los resultados obtenidos de un laboratorio a una aplicación clínica, tal es la vía de administración empleada, ya que en su mayoría se utilizan administraciones intraperitoneales que distan en gran medida de las formas terapéuticas tradicionalmente utilizadas en pacientes (Beabrun G. y Gray G.E., 2000). Es por ello que en esta investigación, se inició con la estandarización del efecto ansiolítico o ansiogénico de los fármacos utilizados como referencia vía oral, utilizando diferentes dosis y periodos de evaluación, y con base en los resultados obtenidos, se evaluó el efecto ansiolítico del AEC ρ . En las condiciones experimentales detalladas anteriormente, el aceite esencial obtenido a partir de sus hojas incrementa el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado después de una hora de haber sido administrado en

dosis de 795 y 1000 mg/kg, efecto paralelo al que produce la dosis de 0.023 mg/kg de bromazepam, una benzodiazepina ampliamente utilizada en el tratamiento de ansiedad (Davidson J.R.T., 2004). Por otra parte la dosis de 316 mg/kg, incrementa significativamente la permanencia en los brazos cerrados, un efecto parecido al que produce la cafeína en el minuto 120 con la dosis de 20 mg/kg.

Para asegurar que las diferencias en la exploración en el laberinto elevado se deben al efecto de conducta y no motor, los animales fueron sometidos inmediatamente después de este ensayo a la prueba a campo abierto. Los resultados obtenidos de esta prueba indican que el tratamiento agudo con el AECp administrado vía oral no tiene efectos motores en una hora cuando se administran las dosis de 500 y 795 mg/kg, al igual que para la dosis de 0.023 mg/kg de bromazepam, es decir, es la dosis ansiolítica que no produce efectos colaterales. Por otra parte, se registró disminución de la actividad del animal en una hora cuando se administró la dosis de 316 y 1000 mg/kg, así como en dos horas para las cuatro dosis utilizadas del aceite vegetal, lo que indica un claro efecto sedante después de este tiempo.

Por lo anterior, proponemos que el AECp produce acción ansiolítica en las ratas evaluadas en laberinto elevado, sin embargo, induce ansiedad con la dosis de 316 mg/kg y provoca sedación después de una hora de su administración, aún a la dosis mas pequeña. Este efecto dual, puede ser explicado por el hecho de estar evaluando una aceite esencial, es decir, se trata de una mezcla compleja de compuestos químicos que están ejerciendo efectos sinérgicos o antagonistas muy

probablemente a diversos niveles del SNC, como ya se ha explicado en algunas revisiones sobre las acciones farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de algunos fitofármacos que tienen la capacidad de minimizar, magnificar, u oponer diversos efectos aditivos que no ocurrirían si estos compuestos se administraran de forma aislada (Spinella M., 2002; Fugh-Berman A., 2000). Existen antecedentes sobre ésta y otras familias de plantas, de cuyos extractos obtenidos a partir de sus hojas y raíces, se han demostrado efectos ansiolíticos utilizando los mismos modelos animales empleados en esta investigación (Hoon A.H. y Seong C.H., 1999; Kurt M.S. *et al.*, 2003; Roth C.F.M. y Costa M., 2002; Suárez A. *et al.*, 2003; Molina H.M., *et al.*, 2004; Sousa F.C.F. *et al.*, 2004; Mora S. *et al.*, 2005).

Con base a los resultados anteriores las dosis y periodos de evaluación que se eligieron para realizar la evaluación en placa perforada, fueron aquellos en los que no se presentaron efectos colaterales motores. En esta prueba, se evalúa la actividad exploratoria del animal mediante su curiosidad que se manifiesta por el número de husmeos y la duración de cada uno de ellos. Un decremento en esta actividad denota pasividad debida a un probable efecto sedante con intervención de efectos motores (Takeda H. *et al.*, 1998). Después de una hora de la administración del bromazepam (0.023 mg/kg), es capaz de incrementar la conducta exploratoria, al igual que la dosis de 795 mg/kg del AECp contrario a lo que sucede con la dosis administrada de 1000 mg/kg de *C. pringlei*, coincidentemente con el efecto ansiolítico obtenido de la prueba de laberinto elevado para los dos primeros tratamientos, y la disminución de la actividad producido por este último. Estos resultados coinciden con trabajos anteriores en

los que se observan incrementos en la conducta exploratoria en ratones después de tratarlos con benzodiazepinas o extractos vegetales con propiedades ansiolíticas, y un efecto sedante a dosis mayores expresado por la disminución de los husmeos y locomoción (Crawley J.N., 1985; Lourenco da Silva A. y Elisabetsky E., 2001; Sonavane G. *et al.*, 2001; Suárez A. *et al.*, 2003; Sousa F.C.F. *et al.*, 2004). Por lo anterior, la reducción de la actividad exploratoria producida por la dosis de 20 mg/kg de cafeína en dos horas, se explica por su efecto ansiogénico sin efectos colaterales motores.

Finalmente, mediante el ensayo de Irwin fue posible corroborar los resultados anteriores, en los que se observa una tendencia a la pasividad producida por el AECp después de dos horas, muy parecida a la que produjo el bromazepam, lo cual se manifiesta mediante su respuesta motora, neurológica y sensorial. Además mediante la prueba complementaria se descartó la posibilidad de afecciones motoras, ya que no se detectan alteraciones en la postura general y la orientación de las extremidades.

En conclusión, los resultados evidencian que el AECp posee efecto ansiolítico y sedante en ratas en un rango terapéutico muy limitado que no se ajusta proporcionalmente a las dosis administradas, ello debido probablemente a las interacciones de los diversos compuestos presentes en el aceite. Los hallazgos obtenidos aquí son relevantes, debido a que por primera vez se evaluó formalmente mediante una estandarización vía oral, el uso tradicional de *C. pringlei*, una importante planta medicinal distribuida ampliamente en los estados

de Nuevo León, San Luis Potosí y Durango (Standley P.C., 1982), utilizada en el tratamiento de alteraciones del SNC. Por esto, resulta importante el aislamiento y caracterización de los principales compuestos del aceite esencial de *C. pringlei*, además de las valoraciones cuantitativas de cada uno de ellos.

Figura 1: Curva de toxicidad aguda del AECp en ratones macho adultos. El aceite se administró por medio de una cánula esofágica en dosis logarítmicas correspondientes a 316, 500, 795, 1000, 2000, 3000 y 5000 mg/kg de peso (n=3). DL_{50} = 2433 mg/kg, lo cual corresponde a un nivel moderadamente tóxico.

Figura 2: Efecto de la administración oral en ratas de cafeína (10, 20, 40, 80 mg/kg) y bromazepam (0.023, 0.049, 0.092 mg/kg) sobre la actividad exploratoria en laberinto elevado (**a** y **c**) y su efecto motor (**b** y **d**) en campo abierto durante cuatro periodos de evaluación. Efecto ansiogénico hallado con 20 mg/kg de cafeína en el minuto 120 (**a**) y efecto ansiolítico encontrado con 0.023 mg/kg de bromazepam en el minuto 60 (**c**) sin efectos colaterales motores (**b** y **d**). Cada punto representa el promedio \pm la desviación estándar (n=7) *P< 0.05 ANOVA seguido por la prueba de Tukey.

Figura 3: Efecto del AECp (316, 500, 795, 1000 mg/kg) sobre la actividad exploratoria en la prueba de laberinto elevado frente a bromazepam 0.023 mg/kg y cafeína 20 mg/kg. Cada columna representa la media \pm la desviación estándar de la diferencia de permanencia en los brazos cerrados y los brazos abiertos (**a**) y su efecto motor (**b**). Todos los tratamientos fueron administrados vía oral 60 minutos antes de la evaluación. (n=7) *P< 0.05 ANOVA seguido por la prueba de Tukey.

Figura 4: Efecto del AECp (316, 500, 795, 1000 mg/kg) sobre la actividad exploratoria en la prueba de laberinto elevado frente a bromazepam 0.023 mg/kg y cafeína 20 mg/kg. Cada columna representa la media \pm la desviación estándar de

la diferencia de permanencia en los brazos cerrados y los brazos abiertos (a) y su efecto motor (b). Todos los tratamientos fueron administrados vía oral 120 minutos antes de la evaluación. (n=7) *P< 0.05 ANOVA seguido por la prueba de Tukey.

Figura 5: Efecto de diversos tratamientos sobre la duración de los husmeos en la prueba de placa perforada. Las evaluaciones se realizaron durante un período basal (100 %), una y dos horas después del tratamiento. Cada columna representa el porcentaje de la media de la duración los husmeos realizados por el animal durante 5 minutos con respecto a las mediciones basales (n=7) * P< 0.05 ANOVA seguido por la prueba de Tukey

Tabla 1: Resumen de la estandarización oral en ratas tratadas con cafeína y bromazepam.

Tratamiento	Periodo de evaluación (minutos)	Ansiolítico	Cambios en actividad locomotora
Bromazepam			
0.023 mg/kg	60	Si	No
	120	No	No
0.049 mg/kg	60	Si	Si
	120	Si	Si
0.092 mg/kg	60	No	Si
	120	No	Si
Cafeína		Ansiógeno	
10 mg/kg	60	No	No
	120	No	No
20 mg/kg	60	No	No
	120	Si	No
40 mg/kg	60	No	No
	120	Si	Si
80 mg/kg	60	No	Si
	120	Si	Si

Con base a la actividad exploratoria en laberinto elevado y su efecto motor en campo abierto en dos evaluaciones, se encontró efecto ansiogénico con 20 mg/kg de cafeína en el minuto 120 y efecto ansiolítico con 0.023 mg/kg de bromazepam en el minuto 60 sin efectos colaterales motores (ambos efectos señalados en tono gris) n=7.

Tabla 2: Resumen de los efectos ansiolíticos y motores de cuatro dosis de AECp.

Dosis	Período de evaluación	Ansiolítico	Ansiógeno	Cambios en la actividad locomotora
316 mg/kg	60	No	Si	Si
	120	No	Si	Si
500 mg/kg	60	No	No	No
	120	No	No	Si
795 mg/kg	60	Si	No	No
	120	No	No	Si
1000 mg/kg	60	Si	No	Si
	120	No	No	Si

Efecto ansiolítico hallado con la dosis de 795 y 1000 mg/kg en el minuto 60, para la primera sin efectos colaterales motores (señalado en tono gris) n=7.

Tabla 3: Efectos de los diferentes tratamientos administrados para la prueba de Irwin durante la evaluación en una y dos horas.

PERFIL	PARÁMETROS	MINUTOS	TRATAMIENTO					
			795 mg/kg		Bromazepam 0.023 mg/kg		Cafeína 10 mg/kg	
NEUROLÓGICO								
	Actividad espontánea	60	3.7	2.6-4.7	2.1	1-3.3	6.5	5.2-7.8*
		120	3.2	2.1-4.4	2.0	0.5-0.8	6.5	5.2-7.9*
	Estado de Alerta	60	3.5	2.5-4.6	2.6	1.5-3.7	6.4	5.2-7.5*
		120	3.6	2.6-4.5	2.0	1-2.9	6.6	5.6-7.5*
SENSORIAL								
	Estímulo sobre el cuerpo	60	2.9	1.4-4.2	3.0	1.4-4.5	6.4	5.1-7.7*
		120	2.9	1.7-4	2.9	1.7-4	5.7	4.6-6.7*
	Reflejo ipsolateral flexor.	60	4.0	3.2-4.8	3.8	2.9-4.7	5.6	4.5-6.7
		120	3.6	2.6-4.5	3.1	2.2-4.0	5.6	4.6-6.5*
	Reflejo auditivo.	60	3.1	2.3-4	2.6	1.7-3.6	5.2	4.2-6.3*
		120	2.0	0.8-3.2	2.2	1.0-3.5	5.0	3.4-6.5*
	Reflejo corneal	60	2.9	2-3.7	2.9	2.0-3.7	4.7	3.6-5.9
		120	3.1	2.2-4.0	2.6	1.7-3.5	4.9	3.9-5.9
	Respuesta al ruido.	60	2.7	2.1-3.3	2.3	1.7-2.9	5.6	4.2-6.9
		120	2.9	2.0-3.7	3.1	2.3-4.0	5.4	4.2-6.7*
MOTOR								
	Fuerza presora.	60	4.7	3.8-5.6	3.5	2.5-4.4	5.7	4.4-6.9*
		120	4.0	2.8-5.2	4.0	2.8-5.2	5.2	3.8-6.7
	Tono muscular.	60	3.9	3.3-4.3	3.5	2.0-9.4	5.3	4.7-5.9*
		120	3.7	3.1-4.3	3.1	2.5-3.7	4.8	4.8-6.0*

No se hallaron diferencias significativas entre el tratamiento con AECp (795 mg/kg) y bromazepam (0.023 mg/kg).

* Indica diferencia significativa entre los tratamientos con AECp frente cafeína con límites de confianza al 95 %. Los resultados se compararon por medio de Kruskal Wallis, seguido por una U de Mann-Whitney $P < 0.025$.

REFERENCIAS

1. Akhondzadeh S., Naghavi H.R., Vazirian M., Shayeganpour A., Rashidi H., Khani M., (2001) Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **26**:363-367.
2. Baldwin H.A., Hohnston A.L. File S.E., (1989) Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. **159**(1): 211-215.
3. Bhattacharya S.K., Saryan K.S., Chakrabarti A., (1997) Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats, *Journal of Psychopharmacology* **11**(3): 219-224.
4. Beaubrun G.M. Gray G.E. (2000) A Review of Herbal Medicines for Psychiatric Disorders. *Psychiatric services* **51**(9): 1130-1134.
5. Castillo C.G., Montante M., Dufour L., Martínez M.L., Jiménez-Capdevill M.E., (2001) Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology* **24**: 797-804.
6. Chen S.W., Min L., Li W.J., Kong W.X., Li J.F., Zhang Y.J., (2004) The effects of angelica essential oil in three murine test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* **79**: 377-382.
7. Crawley J.N., (1985) Exploratory behaviour models of anxiety in mice. *Neuroscience Biobehavioral* **9**(1): 37-44.
8. Davidson J.R.T., (2004) Use of Benzodiazepines in social anxiety disorder, generalized anxiety disorder, and posttraumatic stress disorder. *Journal Clinical Psychiatry* **65**(5): 29-33.
9. Franck C.L., (1992) Toxicología Básica, Riesgos por exposición a sustancias tóxicas, Editorial Harla, EUA, 103,104.
10. Fugh-Berman A., (2000) Interacciones hierbas-fármacos. *Lancet* **355**: 134-138.
11. Garzón de la Mora P., García-López P.M., García Estrada J., Navarro-Ruiz A., Villanueva-Michel T., Villarreal-de Puga L.M., Casillas-Ochoa J., (1999) *Casimiroa edulis* seed extracts show anticonvulsive properties in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **68**: 275- 282.
12. González S.A., (2003) Monografías sobre plantas medicinales. *Herbal safety*. <http://www.herbalsafety.utep.edu/esp/intro/default.htm>

13. Hoon A.H., Seong C.H., (1999) Studies on the anxiolytic activity of *Eurycoma longifolia* jack roots in mice. *Journal of Pharmacology* **79**: 497-500.
14. Irwin S., (1962) Drug screening and evaluative procedures. *Science* **136**(13): 123-128.
15. Johns M.C., (1999) Herbal remedies: adverse effects and drug interactions. *American Academy of family physicians* **59**(5): 1239-1244.
16. Jones N., Duxon M.S., King S.M., (2002) Ethopharmacological analysis of unstable elevated exposed plus maze, a novel model of extreme anxiety: predictive validity and sensitivity to anxiogenic agents. *Psychopharmacology* **161**(3): 314-323.
17. Kalueff A.V., Tuohimaa P., (2004) Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiologiae Experimentals* **64**: 439-448.
18. Kurt M.S., Bilge S., Kukula O., Celik S., Kesim Y., (2003) Anxiolytic- like profile of propofol, a general anesthetic, in the plus-maze test in mice. *Polish Journal of Pharmacology* **55**: 973-977.
19. Litchfield J.T y Wilcoxon F.J., (1949) Method of Lichfield and Wilcoxon: Confidence limits of ED50. *Journal of Pharmacology Exp. Ther.* **96**:99-113.
20. López V.F.J., Van W.M., Galindo M.J., Illescas R.R., Esquinca R.J., Alcocer N., (2004) Thomson PLM Diccionario de especialidades Sistema Nervioso Central, 4ª Edición, Colombia, 535-538.
21. Lourenco da Silva A., Elisabetsky E., (2001) Interference of propylene glycol with the hole-board test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**: 545-547.
22. Lozoya X., Enriquez R., (1981) El zapote blanco. CONACYT, México, 17-31.
23. Lozoya X., Romero G., Olmedo M., Bondani A., (1977) Pharmacodynamics of alcoholic and aqueous extracts from the *Casimiroa edulis* seed. *Archivo de Investigación Médica* **8**(2): 145-154.
24. Magos G.A., Vidrio H., Reynolds W.F., Enríquez R.G., (1999) Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology* **64**: 35-44.

25. Molina H.M., Tellez-Alcántara N.P., Pérez G.J., Olivera-López J.I., Jaramillo M.T., (2004) Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 93-98.
26. Mora S., Díaz-Veliz G., Lungenstrass H., García G.M., Coto-Morales T., Poletti C., De Lima T.C.M., Herrera Ruiz M., Tortoriello J., (2005) Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* **97**:191-197.
27. Moreno L.R., (2000) Practicas de Farmacodinamia; Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad Cardenal Herrera CEU, España.
28. Moretti M.D., Sanna-Passionoi G., Demontis S., Bazzoni E., (2002) Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control *AAPS PharmSciTech* **3**(2): 1-11.
29. Müller W.E., Singer A., Wonnemann M., Hafner U., Rolli M., Schäfer C., (1998) *Farmacopsiquiatria* **31**: 16-21.
30. Navarro R.A., Bastidas R.B.E., García Estrada J., García L.P., Garzón P., (1995) Anticonvulsant activity of *Casimiroa edulis* in comparison to phenytoin and phenobarbital. *Journal of Ethnopharmacology* **45**: 199-206.
31. OECD/OCDE., (2000) Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity- Fixed Dose Procedure.
32. Parra V.A., Ramos R.A., Villaescusa G.A., Betancourt B.J., García L.A., Piloto F.J., Décalo M.M., (2002) *Passiflora incarnata* L. y *Senna alata* (L.) Roxo: Estudio toxicogenético que emplea 2 sistemas de ensayos a corto plazo. *Revista Cubana Planta Médica* **7**(1): 27-31.
33. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M., (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* **14**: 149-167.
34. Roth C.F.M. y Costa M., (2002) Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *citrus aurantium* L. *Biological Pharmacology Bull* **25**(12) 1629-1633.
35. Schmitt U., Hiemke C., (1998) Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behaviour. *Prog. Neuro-Psychopharmacology and Psychiatry* **22**: 1197-1215.

36. Sonavane G., Sarveiya V., Kasture V., Kasture S.B., (2001) Behavioural actions of *Myristica fragans* seeds. *Indian Journal of Pharmacology* **33**: 417-424.
37. Sousa F.C.F., Melo C.T.V., Monteiro A.P., Lima V.T.M., Gutierrez S.J.C., Pereira B.A., Barbosa-Filho J. M., Vasconcelos S.M.M., Fonteles M.F., Viana G.S.B., (2004) Antianxiety and antidepressant effects of riparian III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **78**: 27-33.
38. Spinella M., (2002) The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. *Alternative Medicine Review* **7**(2): 130-137.
39. Standley P.C., (1982) Trees and Shubs of México. Smithsonian Institution, United States National **23**(1):820-822.
40. Suárez A., Echandi M.M., Ulate G., Cicció J.F., (2003) Pharmacological activity of the essential oil of *Satujera viminea* (*Lamiaceae*). *Revista de Biología Tropical* **51**(1):247-252.
41. Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., (1998) Changes in head-dipping behaviour in the hole board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* **350**: 21-29.
42. Wasowski V.H., Levi de Stein L., Wolfman C., Silveira R., Dajas F., Medina J.H., Paladini A.C., (1995) Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Médica* **61**(3): 213-216.
43. Yilmazer-Hanke D.M., Roskodan T., Zilles K., Schwegler H., (2003) Anxiety-related behaviour and densities of glutamate, GABA_A, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdale of seven inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research* **145**: 145-159.
44. Zanolli P., Avallone R., Baraldi M., (2000) Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia* **1**:S117-23.

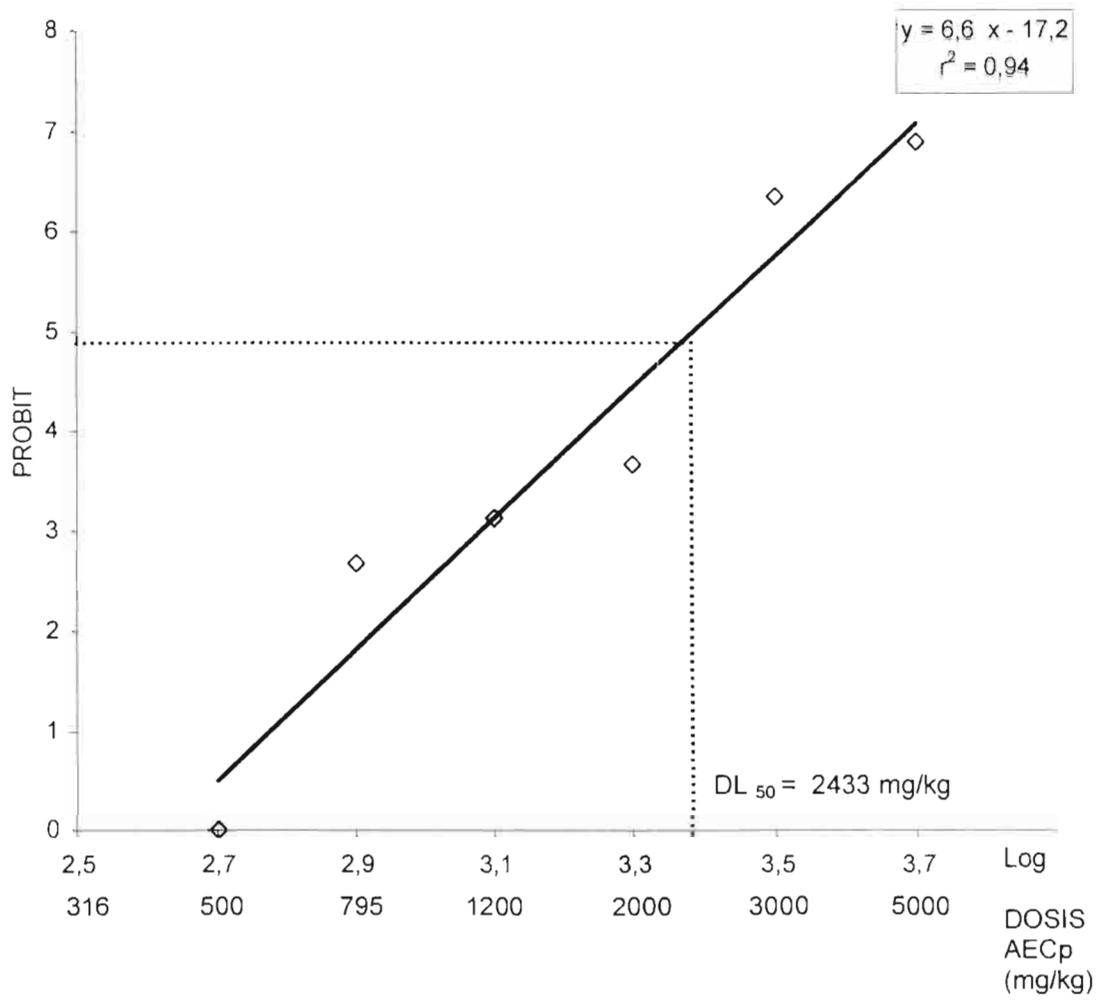


Figura 1

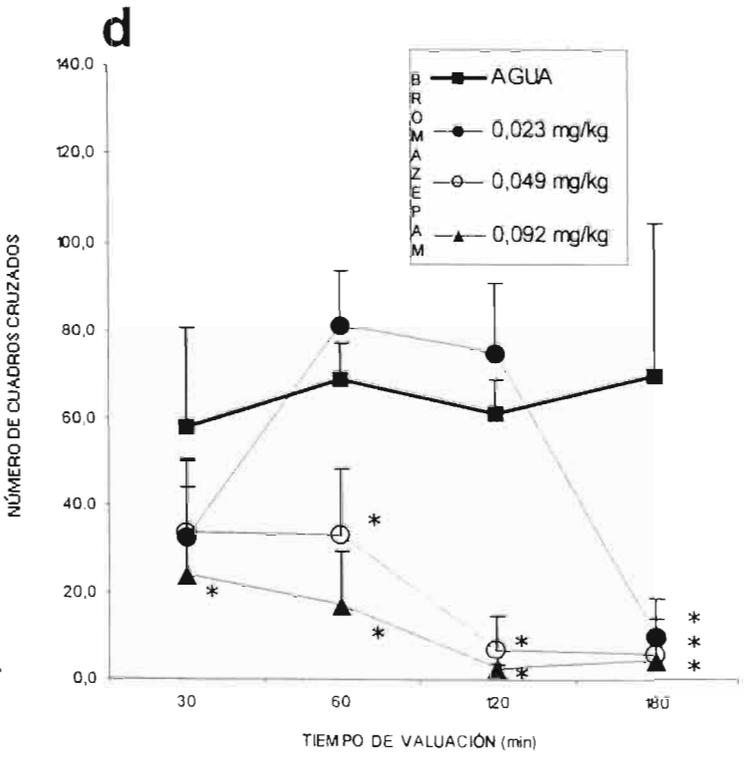
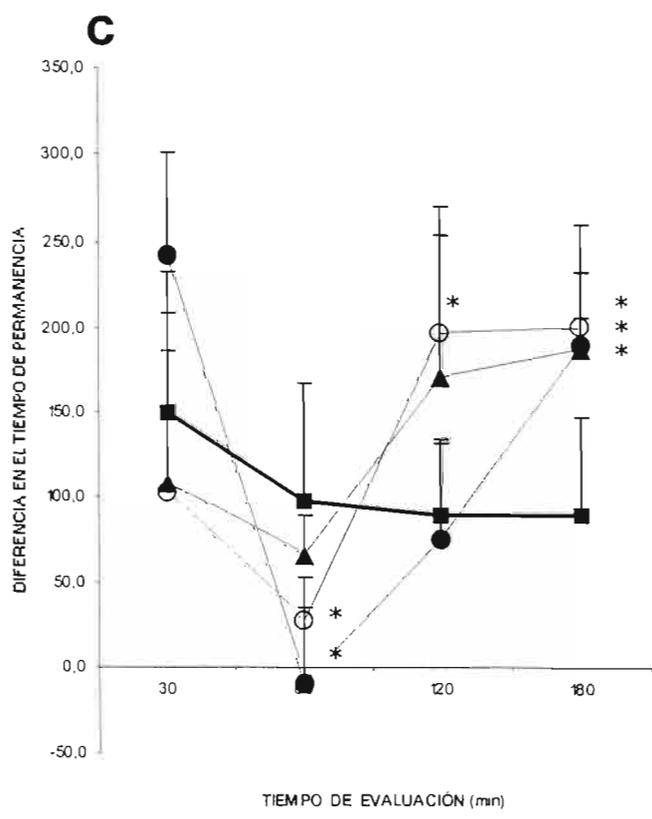
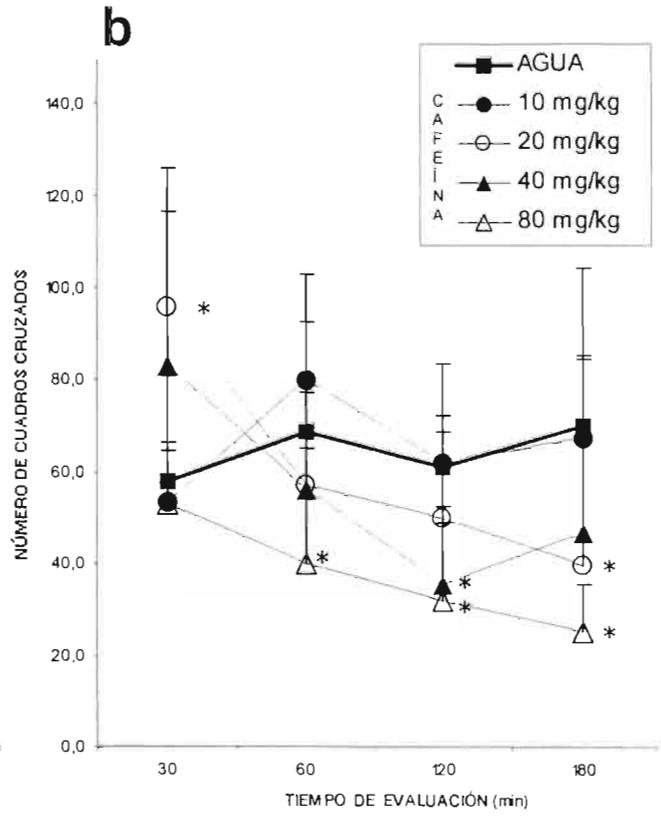
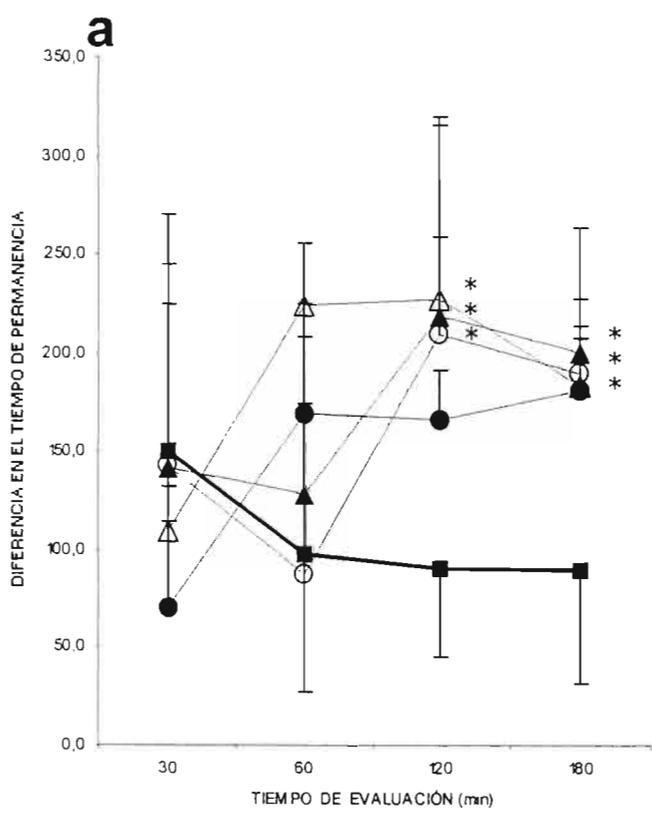


Figura 2

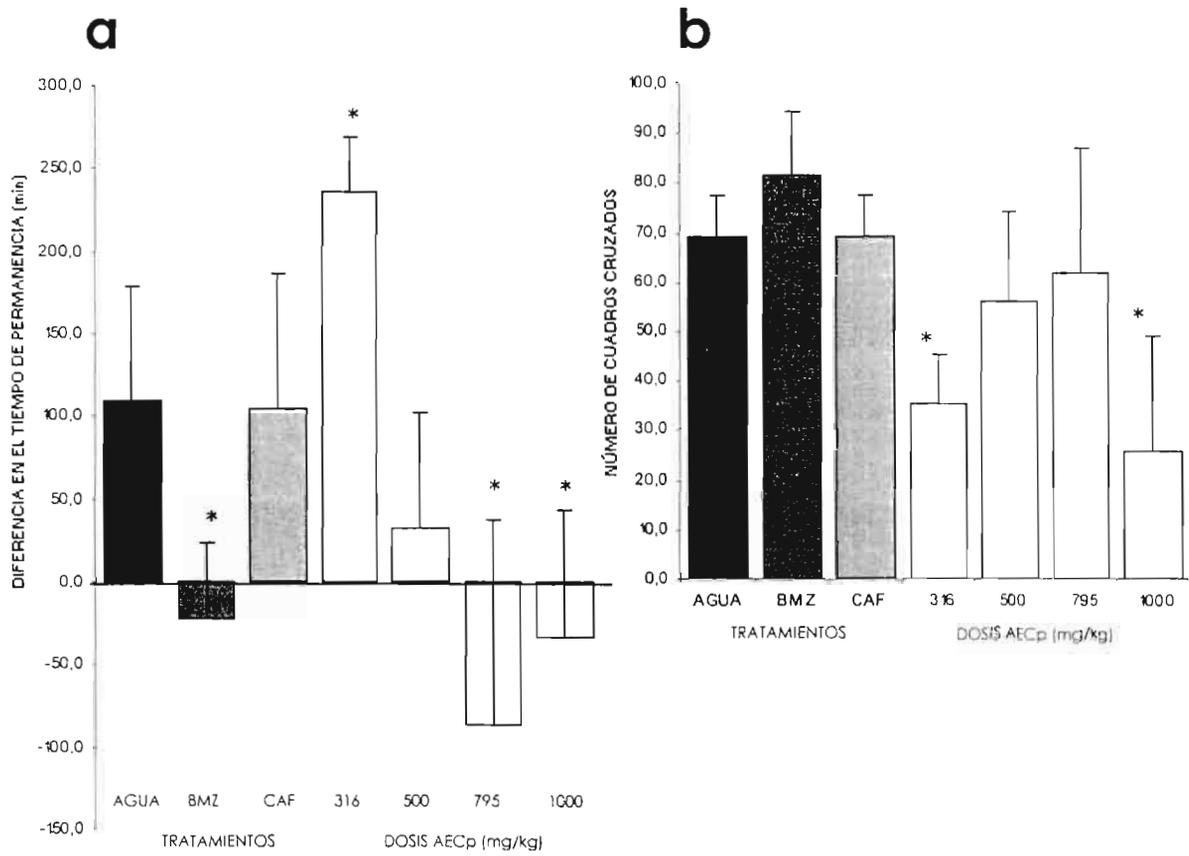


Figura 3

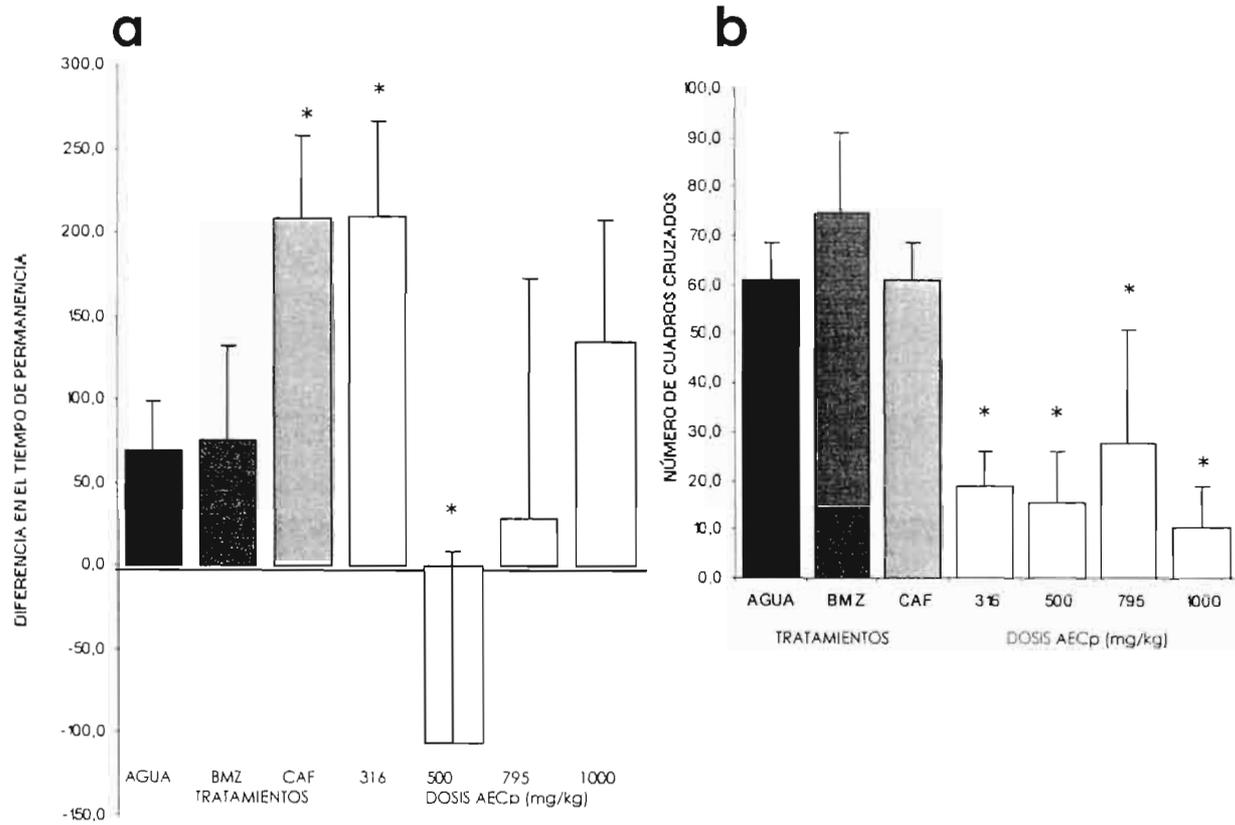


Figura 4

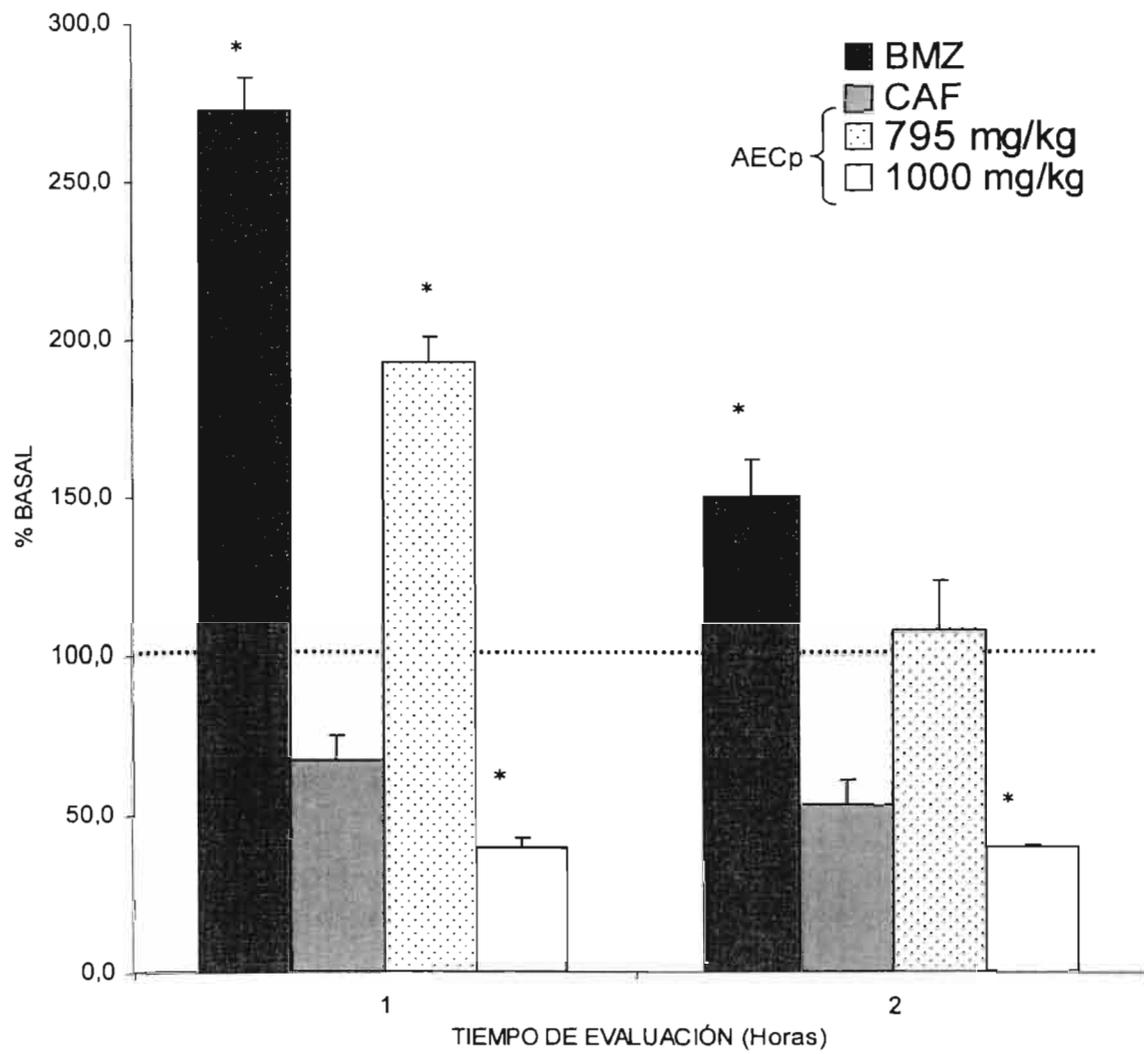


Figura 5

SISTEMA DE BIBLIOTECAS
Instituto de Investigación de Zonas
Desérticas, UASLP