

Tesis de Posgrado

Ansiolíticos de origen natural en plantas de uso medicinal folklórico

Viola, Haydée Ana María

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Viola, Haydée Ana María. (1995). Ansiolíticos de origen natural en plantas de uso medicinal folklórico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2746_Viola.pdf

Cita tipo Chicago:

Viola, Haydée Ana María. "Ansiolíticos de origen natural en plantas de uso medicinal folklórico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2746_Viola.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Ansiolíticos de origen natural en plantas de uso medicinal folklórico"

Autor: Lic. Haydée Ana María Viola

Director: Dr. Jorge Horacio Medina

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias
"Prof .Dr. Eduardo de Robertis"
Facultad de Medicina. U.B.A.

Tesis para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1995

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director, el Dr. Jorge H. Medina, porque cada día trasmite su sabiduría, su voluntad laboral, su entusiasmo por la ciencia y genera provechosos espacios de discusión

Agradezco a la Dra. Claudia Wolfman por "todas" sus enseñanzas y por la buena predisposición a prestar ayuda.

Agradezco al Dr. Alejandro C. Paladini , a la Lic. Cristina Wasowski y a la Lic Mariel Marder por la seriedad y por la responsabilidad con la que se llevó a cabo este proyecto laboral y porque representan un ejemplo de la motivación hacia la tarea científica.

Agradezco a quienes comparten el espacio y el tiempo de trabajo: Dra. Diana Jerusalinsky, Lina Levi de Stein, Lic. Edgar Kornisiuk, Lic. Rudy Bernabeu, Lic. Martín Cammarota, Paula Alfaro y Carolina, por la calidez, la cooperatividad y la constante buena onda.

Dedico este trabajo a mi familia, por el amor que siempre me demuestran.

ABREVIATURAS

ACN: acetonitrilo
B: ligando unido (bound)
B_{máx}: máxima cantidad de ligando marcado unido a receptor
BZD: benzodiazepinas
CCD: contracorriente
cm: centímetro
DZ: diazepam
ES: error standar
F: ligando libre (free)
fig: figura
fmoles: femtomoles
FNZ: flunitrazepam
g: gramo
GABA: ácido gama amino butírico
HPLC: cromatografía líquida de alta performance
³H: tritio
IC₅₀: concentración del inhibidor que desplaza el 50% del ligando marcado
icv: intracerebroventricular
ip: intraperitoneal
K_d: constante de disociación
K_i: constante de inhibición
log: logaritmo decimal
MAO: mono amino oxidasa
min: minuto
mg/kg: miligramo por kilo
PM: peso molecular
PTZ: pentilenetetrazol
RCBZD: receptor central a las benzodiazepinas
rpm: revoluciones por minuto
SNC: sistema nervioso central
TBPS: t- butilbiciclofosforotionato
TLC: cromatografía en capa delgada
UI: unidades arbitrarias de inhibición
5HT: serotonina

INDICE

	página
INTRODUCCION	
- Receptor central a las BZD: sitio de acción de drogas	1
- Efectos farmacológicos de las BZD: "Pro y contras"	6
- Bases bioquímicas de la acción farmacológica de las BZD	9
- ¿Existen ligandos endógenos del receptor a BZD?	11
- Productos naturales y su utilidad en la búsqueda de drogas	13
- Flavonoides: un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en las plantas	16
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	
- Ensayos de extracción, purificación e identificación	20
- Ensayos bioquímicos de unión al RCBZD	21
Determinación de la IC ₅₀ y de la Ki	21
Curvas de saturación	22
- Experimentos de flujo de ³⁶ Cl ⁻	22
- Tests farmacológicos	24
Actividad locomotora	24
Laberinto en cruz elevado	25
Experimentos crónicos	26
"Hole board"	27
Alambre	28
Prevención de convulsiones	29
Potenciación de la inducción del sueño	29
- Test para el tratamiento estadístico	31
RESULTADOS	
- CAPITULO I: Crisina, un flavonoide aislado de la <i>Passiflora coerulea</i> , que reconoce al RCBZD y posee efectos ansiolíticos	32
- Aislamiento e identificación de crisina	33

- Ensayos de unión con radioligandos	37
- Medición del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de corteza de rata	38
- Efectos farmacológicos	39
-Discusión	45
- CAPITULO II: Apigenina, un ansiolítico natural aislado de la <i>Matricaria recutita</i>	48
- Aislamiento e identificación de la 5,7,4'trihidroxiflavona (apigenina)	49
- Ensayos de unión con radioligandos	53
- Medición del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de corteza de rata	54
- Efectos farmacológicos de la apigenina	55
- Discusión	62
- CAPITULO III: Aislamiento de ligandos al RCBZD con actividad farmacológica, a partir de <i>Tilia tomentosa</i>	65
- Aislamiento e identificación de kaempferol	66
- Experimentos de unión al RCBZD	67
- Farmacología del kaempferol	68
- Reconocimiento de una fracción parcialmente purificada con afinidad al RCBZD y que posee efectos farmacológicos	69
- Experimentos de unión al RCBZD	70
- Farmacología de la fracción parcialmente purificada del extracto de <i>Tilia tomentosa</i>	70
- Discusión	73
- CAPITULO IV: Ligandos del RCBZD con acción sedativa e hipnótica en extractos de <i>Salvia guaranítica</i>	75
- Fraccionamiento del extracto crudo de <i>Salvia guaranítica</i>	76
- Ensayos farmacológicos de las fracciones crudas obtenidas de la contracorriente	76
- Purificación de la fracción 4	81
- Caracterización farmacológica de la fracción 4	82
- Purificación de las fracciones C + D	84
- Caracterización farmacológica de las fracciones	85

- Perfil bioquímico de desplazamiento de ^3H FNZ al RCBZD por la fracción 3	87
- Discusión	88
- CAPITULO V: Relación estructura-función de los flavonoides como ligandos del RCBZD	91
- Experimentos farmacológicos con flavona	92
- Medición de IC_{50} y potencia ansiolítica de una serie de flavonoides derivados de la crisina y la apigenina	93
- Discusión	94
DISCUSIÓN GENERAL	97
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFIA	106

INTRODUCCION

La ansiedad es una emoción displacentera experimentada por una gran proporción de personas que parece incrementar con el desarrollo de la sociedad moderna. La herramienta clásica para combatirla son las benzodiazepinas, drogas sintéticas introducidas en el mercado desde 1960. Esta serie de compuestos ejercen variados efectos farmacológicos actuando sobre receptores específicos en el sistema nervioso central. Se conoce que su mecanismo de acción permite modular positivamente las sinapsis gabaérgicas inhibitorias, disminuyendo la estimulación neuronal.

Muchos son los esfuerzos e intereses en desarrollar nuevos fármacos que presenten más ventajas y disminuyan los riesgos en la terapia de la ansiedad. Además de la síntesis orgánica de compuestos, existen otras rutas para la búsqueda de drogas activas, muchas de ellas fueron descubiertas gracias a la investigación científica de creencias folklóricas. Este conocimiento etnofarmacológico brinda información acerca de prácticas medicinales populares realizadas con diversas especies vegetales a las que se le atribuyen poderes curativos. En la actualidad, el consumo de "infusiones tranquilizantes" continúa siendo un paliativo para nuestro alterado sistema nervioso central. Sin embargo, a pesar de la aceptación empírica de estos brevajes, poco es lo que científicamente se conoce de ellos.

En este trabajo se logró purificar, identificar y caracterizar bioquímica y farmacológicamente a una serie de productos naturales aislados a partir de: *Passiflora coerulea*, *Matricaria recutita*, *Tilia tomentosa* y *Salvia guaranitica*, conocidas plantas de uso medicinal folklórico. Estas moléculas activas pertenecen al grupo de los flavonoides y permitieron reconocer y postular a una nueva familia de ligandos al receptor central a las benzodiazepinas con acción selectivamente ansiolítica.

Receptor central a benzodiazepinas: sitio de la acción de drogas

En 1977 se reportó la presencia de sitios de unión específicos y saturables, de alta afinidad para benzodiazepinas (BZD) en cerebro de rata (Mohler y Okada, 1977; Squire y Braestrup, 1977; Mohler y Okada, 1978). Desde entonces se comenzó a entender el mecanismo de acción de las BZD que contaban ya con una década de prescripción en uso clínico.

La consistente correlación entre afinidad de unión, potencia ansiolítica y dosis efectivas de una gran serie de BZD (Tallman y col, 1978) dió énfasis a la hipótesis que el mecanismo de acción de estos agentes involucra a dicho receptor; consecuentemente, el bloqueo con

antagonistas específicos previene los efectos farmacológicos (Darragh y col, 1981; Hunkeler y col, 1981).

En la búsqueda de aislar el receptor central a benzodiazepinas (RCBZD) mediante cromatografía de afinidad con agonistas, se obtuvo un heterooligómero que presenta además afinidad para el ácido gamma amino butírico (GABA). Se identificaron dos subunidades: α con afinidad a las BZD (Sigel y col, 1993) y β con afinidad a agonistas GABA (Stephenson, 1988). Ellas coinmunoprecipitan con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia α o β , mostrando que integran una misma estructura (Schoch y col, 1985).

El complejo que reúne a estos receptores se denomina GABA_A y está constituido por cinco clases de subunidades con sus respectivas isoformas llamadas: α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ y ρ 1-2 que se ensamblan en cientos de combinaciones estequiométricas diversas, aún no conocidas (Stephenson, 1993). La estructura proteica resultante delimita un canal que es permeable al Cl⁻ (fig 1).

Cuando el neurotransmisor GABA es liberado al espacio sináptico, la unión a su receptor activa la apertura del canal y el Cl⁻ ingresa a la neurona debido a su potencial electroquímico. En consecuencia, el aumento intracelular de cargas negativas contrarresta estímulos excitatorios y dificulta la descarga de potenciales de acción (Hommer y col, 1987).

Este sistema de neurotransmisión representa una importante proporción de las sinapsis inhibitorias en el cerebro (Roberts y col, 1976) y su función está regulada por el sitio de reconocimiento primario y centros moduladores alostéricos que alteran la probabilidad de la respuesta del receptor al neurotransmisor. Se encuentran diversos y variados sitios receptores en el complejo GABA A y a ellos se pueden unir moléculas que actúen positivamente sobre la apertura del canal (agonistas, agonistas parciales), negativamente (agonistas inversos) o que no introduzcan cambio funcional en el sistema de transducción (antagonistas); a saber:

- sitio de unión a GABA, agonistas, agonistas parciales y antagonistas;
- sitio de unión a las BZD que poseen una amplia gama de efectos moduladores sólo en presencia de GABA (fig 2);
- sitio de unión a picrotoxina y TBPS (t-butilbencilofosforotionato) que parece estar asociado a la conformación cerrada del canal;
- sitio de unión a barbitúricos que prolonga el tiempo de vida del canal activado y a altas concentraciones son eficaces aún en ausencia de GABA;
- sitio para esteroides que provocan un aumento en la conductancia al Cl⁻ prolongando el tiempo de apertura del canal (Peters y col, 1988);

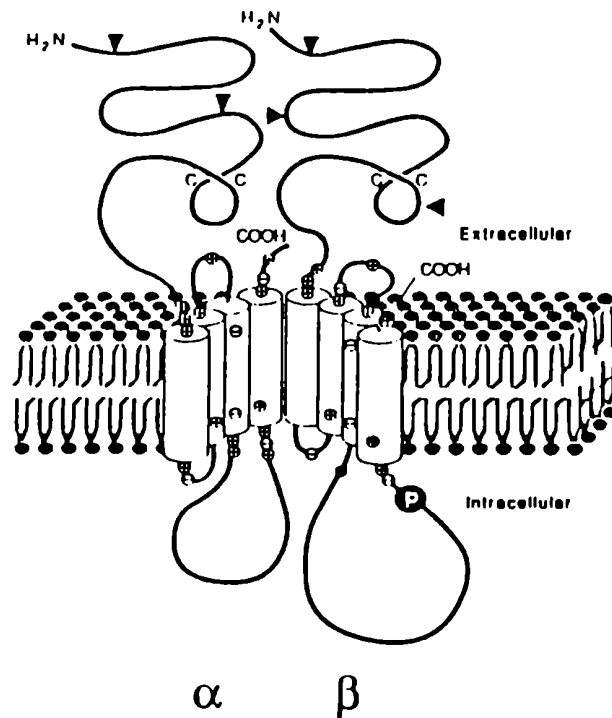
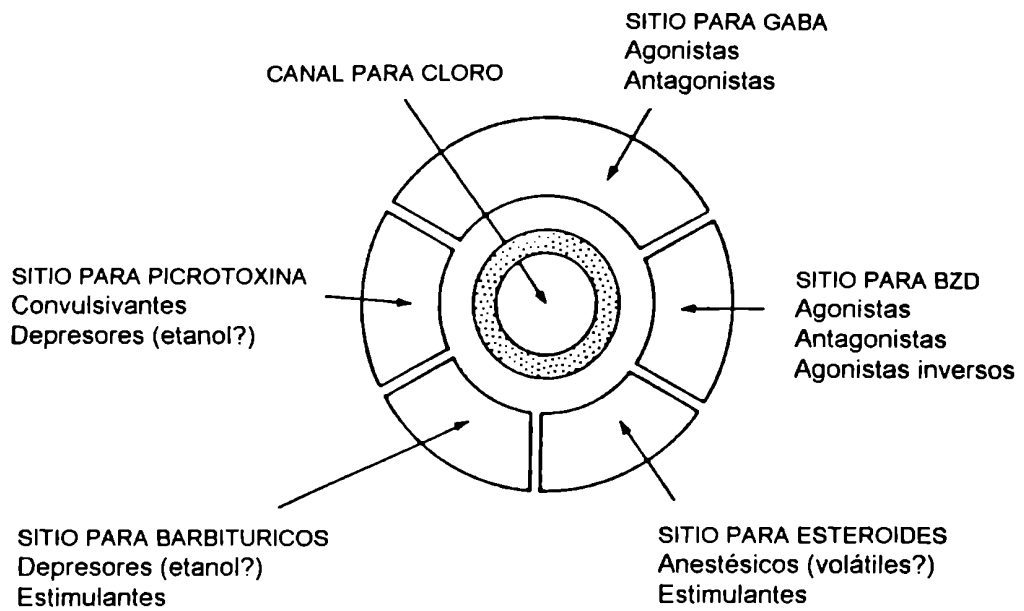


FIG 1: Esquema del complejo receptor GABA_A. Parte inferior: Se muestra las subunidades α y β .

	AGONISTA	AGONISTA PARCIAL	ANTAGONISTA COMPETITIVO	AGONISTA INVERSO PARCIAL	AGONISTA INVERSO
ACTIVIDAD INTRINSECA	+1	-0.4	0	-0.2	-1
	MIDAZOLAN	RO 16-6028	FLUMAZENIL	RO 15-4513	RO 19-4603

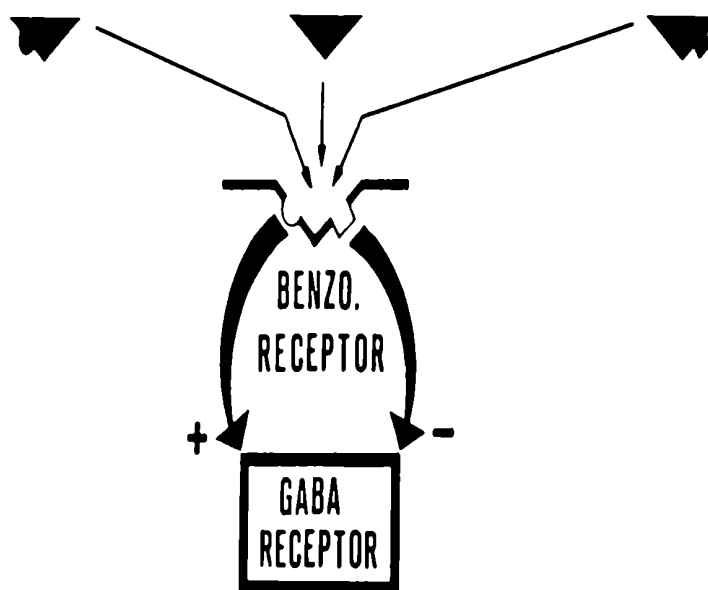


FIG 2: Dibujo esquemático de los cinco tipos de ligandos al receptor central a benzodiazepinas y sus actividades intrínsecas.

- sitio de unión a antihelmínticos (ej. avermectina B1a) que tienen un potente poder insecticida y propician un aumento en la permeabilidad al Cl^- que es revertido por la aplicación de antagonistas del GABA_A (Sieghart, 1992);
- sitio de unión a RO 5-4864 (4'-cloro derivado del diazepam) que es un ligando típico del receptor periférico a BZD. A niveles micromolares interactúa con el GABA_A inhibiendo el flujo de Cl^- estimulado por GABA (Sieghart, 1992);
- sitio de unión a Zn^{2+} que está localizado extracelularmente y funciona inhibiendo la respuesta a GABA. En menor grado es sensible a Cd^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (Celentano y col, 1991);

No todos los receptores GABA_A que se expresan en el sistema nervioso central de mamíferos contienen todos estos sitios alostéricos. Algunas subpoblaciones de receptores GABA_A no tienen por ej. el sitio de unión a Zn^{2+} o a neuroesteroides. Otras subpoblaciones responden mejor a las BZD (ver más adelante).

Evidencias electrofisiológicas revelan posibles sitios para colmeriazol, el anestésico propofol y para el etanol, que aumentan la conductancia al Cl^- (Moody y Skolnick, 1989; Hales y Lambert, 1991).

Estos sitios de unión son a su vez modulados por aniones tales como : Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , SCN^- o ClO_4^- y se observa una trama de interrelaciones entre los compuestos señalados tendientes a favorecer o dificultar la unión en los otros sitios (ver Sieghart, 1992).

Otro nivel de regulación del complejo se basa en su potencialidad para ser fosforilado en las diferentes subunidades por proteínas quinasas (A,C o tirosina quinasa) (Stephenson, 1993), pero la fosforilación de estos sitios tiene distintos efectos dependiendo de la composición proteica del complejo receptor (ver Raymond y col, 1993).

El mecanismo de acción de los agonistas del RCBZD consiste en aumentar la probabilidad de la apertura del canal mediada por GABA (Bormann, 1988; Costa, 1989; Haefely, 1989). Ellos amplifican el efecto de GABA debido a que le incrementan la afinidad por su receptor y facilitan la isomerización del complejo hacia su estado permeable (Haefely, 1989) En experimentos de flujo de Cl^- las BZD aumentan la potencia del muscimol (agonista del receptor a GABA) sin cambiar la afinidad por su receptor, lo que permite proponer un mecanismo más eficiente de acople canal-receptor (Edgar y Schwartz, 1992). Actualmente se conoce, gracias a técnicas de biología molecular, que es requerida la coexpresión de los polipéptidos $\gamma 2$ ó $\gamma 3$ junto con la combinación $\alpha\beta$ para reproducir el espectro completo de acción de ligandos al RCBZD (Pritchett y col, 1989; Ymer y col, 1990). Ello indica que la subunidad γ permitiría el acople de información entre el receptor central de BZD y el de GABA.

Dos tipos de RCBZD fueron originariamente propuestos en base a su farmacología y distribución. La subunidad α define las características del sitio a BZD:

- el subtipo BZD1 corresponde a los receptores que contienen $\alpha 1$ y se encuentran ampliamente ubicados en cerebelo y en menor grado en corteza cerebral e hipocampo;
- el subtipo BZD2 involucra a las subunidades $\alpha 2, 3$ o 5 y se encuentra principalmente en corteza cerebral, hipocampo y médula espinal (Doble y Martin, 1992; Schlichting, 1990).

Existe un tercer tipo de receptor a BZD reportado inicialmente en riñón (Braestrup y Squire, 1977). Posteriormente se determinó su presencia en glía, tejidos periféricos y en neuronas, siendo su localización subcelular fundamentalmente mitocondrial (Krueger, 1991). La función es diferente a los receptores centrales, pues actúan estimulando la síntesis de esteroides en sistema adrenocortical y células de Leydig (Mukhin y col, 1989; Yanagibashi y col, 1989). El suministro de colesterol es el paso limitante en la síntesis hormonal y este receptor está acoplado al transporte de colesterol intermembrana y media su translocación desde la membrana externa a la interna (Krueger y Papadopoulos, 1990).

En los párrafos anteriores se discutió la biología molecular y la farmacología de sólo uno de los tipos de receptores a GABA (**GABA_A**). La transducción de la señal mediada por el receptor **GABA_B** involucra apertura de canales de K^+ o Ca^{2+} e inhibición de la adenilato ciclasa, ambos procesos son modulados por nucleótidos de guanina vía asociación con proteína G (Schlichting, 1990). Este receptor no está homeotípicamente regulado por BZD. Por último, existe un tercer tipo de receptor a GABA, aislado a partir de la retina humana, que se denomina GABA retina, **GABA_p** o **GABA_C**. Es un receptor ionotrópico que permite el pasaje de Cl^- , pero a diferencia del **GABA_A** no es bloqueado por bicuculina, muestra poca desensibilización y no es modulado por barbitúricos o benzodiazepinas (Calvo y col., 1994).

Se debe, entonces, tomar en consideración que no todos los receptores a GABA son modulados por BZD y que se encuentran receptores a BZD que no forman parte del complejo GABA A.

Efectos farmacológicos de las BZD: "Pro y contras"

En la actualidad las BZD son las drogas más comunmente prescritas, debido a su vasto espectro de acciones terapéuticas. Fueron introducidas en el mercado en 1960 y rápidamente reemplazaron el uso del meprobamato y los barbitúricos en el tratamiento de la ansiedad (Baum y col, 1982), una de las manifestaciones más frecuentes en la práctica clínica.

Se define a la ansiedad como un estado emocional vivenciado subjetivamente como displacentero o temeroso (Pratt, 1992). En condiciones normales, una situación amenazante no entorpece la conducta ni las funciones mentales, por el contrario pone en marcha un mecanismo de alerta al estímulo estresante que beneficia el buen funcionamiento individual. La patología sobreviene cuando la respuesta a dicho estímulo es exagerada, irracional e interfiere con las funciones normales del individuo (Braestrup y Nielsen, 1982; Pratt, 1992).

La ansiedad se acompaña de signos tanto en la esfera conductual (expectación aprensiva, aumento de vigilancia, escrudifiamiento del medio ambiente), psíquica (sentimiento de temor, impaciencia, alerta, desatención) y física (inquietud motora, aumento de tensión muscular, sudoración, taquicardia, hipertensión arterial, aumento de la frecuencia cardíaca, vértigo, fatiga, náuseas, anorexia, alteraciones neuroendócrinas e inmunológicas, etc) (Biondi, 1994a).

Existen diferentes clasificaciones en los disturbios de la ansiedad (Biondi, 1994b), las BZD son efectivas en el tratamiento de:

- desórdenes generalizados de la ansiedad caracterizados por un estado de expectación aprensiva sin base real,
- desórdenes de pánico (Judd y col, 1990) con crisis repetidas de temor intenso y que puede presentarse con fobia a los espacios abiertos,
- fobias o temor persistente a un estímulo circunscripto o a una situación social embarazosa,
- desórdenes obsesivos-compulsivos, con ideas recurrentes invasivas y carentes de sentido a las que se responde con conductas repetitivas y estereotipadas,
- disturbios post traumáticos, debido al stress de vivir experiencias incómodas (ej. muertes, enfermedades propias o ajenas).

El uso terapéutico de las BZD no se restringe sólo al tratamiento de la ansiedad. Un detallado análisis sobre su uso clínico es revisado por Hollister y col, 1993.

Entre sus acciones farmacológicas se encuentran:

- eficacia hipnótica, disminuyendo la latencia, aumentando el tiempo total de sueño y reduciendo incidentes de terror nocturno (Hollister y Csernansky, 1990),
- efectos antidepresivos en cuadros ligados a desórdenes de la ansiedad (Swinson, 1989; Warner y col, 1988 y Zung, 1987)
- efectos en desórdenes bipolares con episodios maníacos, alucinaciones, sensación de persecución y síntomas catatónicos,
- efectos sobre la ansiedad asociada a enfermedades médicas incluyendo desórdenes cardiovasculares y gastrointestinales,

- efectos anticonvulsivantes (Eidelberg y col, 1965; Traversa y de Angelis, 1977) y antiépilépticos,
- efectos mio relajantes (Randall 1960; Randall y col, 1961) aplicables a terapias de movimientos involuntarios, mioclonus, tics, temblores, torticolis espásmicas,
- en el tratamiento de los síntomas ocasionados por la interrupción del consumo de alcohol (Sellers y Kalant, 1976) y opiáceos,
- efectos sedativos, cuya consecuencia conductual es la disminución de la actividad general atribuida a una pérdida de vigilancia (Greenshaw y col, 1988) con una positiva correlación con medidas de dificultad psicomotora (Woods y col, 1992),
- también se las utiliza como drogas accesorias en medicaciones preanestésicas, pues reducen la ansiedad, proveen sedación sin pérdida de la conciencia, facilitan la inducción de la anestesia y producen amnesia (Shader y Greenblatt, 1993 pero ver el trabajo de Wikinski y col, 1994).

Por otra parte, las BZD cuentan con una serie de efectos adversos que se deben tomar en consideración en la elección de un tratamiento. Son catalogadas como drogas con riesgo de abuso, capaces de producir dependencia psicológica o fisiológica y de perjudicar el comportamiento individual (Woods y col, 1992).

La dependencia psicológica es entendida como la búsqueda de consumo; la automedicación se observa en sujetos que interrumpen abruptamente el consumo de BZD o en aquellos que abusan de otras clases de drogas o alcohol donde las BZD poseen efectos reforzantes (Busto y col, 1986; Roache y Griffiths, 1987a y Woods y cols, 1987). Sin embargo, en animales, en condiciones de acceso irrestricto a BZD no se aprecia preferencia por sobre la elección del placebo (Woods y col, 1987).

La dependencia fisiológica es el estado de un organismo durante tratamiento con drogas, tal que su interrupción desarrolla reacciones de retiro (abstinencia) reversibles por el reinicio del mismo (Woods y col, 1987).

La interrupción de un tratamiento crónico con BZD ocasiona cuadros de rebote (reaparecen síntomas preexistentes con mayor frecuencia e intensidad), recurrencia (síntomas de gradual aparición pero persistentes) o retiro (donde ocurren sintomatologías nuevas o se exacerban síntomas que no son relevantes al desorden por el cual se prescribió el fármaco, a lo que en sentido estricto se denomina síndrome de abstinencia). El desarrollo de la dependencia está influenciado tanto por la dosis como por la duración del tratamiento (Sanneurd y col, 1989).

Otro factor adverso del uso de BZD se observa luego de su repetida exposición, donde una misma dosis va produciendo menores efectos. Este mecanismo recibe el nombre de tolerancia (Pratt, 1991).

Entre las consecuencias conductuales adversas se encuentra afecciones en la ejecución psicomotora (Woods y col, 1987) y déficit en la capacidad de recordar material aprendido previamente así como impedimento en la adquisición de información, reflejando efectos directos sobre procesos mnemónicos (Bickel y col, 1990; Izquierdo y Medina, 1991).

Esta incursión en el uso clínico de las BZD permite apreciar su importante y disperso rol terapéutico pero también advertir sus riesgos y resaltar que distan de ser fármacos ideales y totalmente inocuos.

Bases bioquímicas de la acción farmacológica de las BZD

Las clásicas BZD, tal como el diazepam (DZ), son agonistas totales del receptor y poseen un amplio perfil de actividad farmacológica que consiste en efectos ansiolíticos y anticonvulsivantes a dosis bajas y sedativos y miorelajantes a dosis altas (Gardner, 1988). Se postula esta graduación de efectos como función de la proporción de receptores que están siendo ocupados (Facklam y col, 1992a). Esta teoría postulada por Clark, propone que la respuesta es linealmente dependiente de la ocupación de los receptores en el cerebro y es máxima cuando éstos se involucran en su totalidad (Clark, 1937).

En la búsqueda de acciones selectivas (por ej. ansiolíticos) se exploran drogas que carezcan de efectos indeseables (por ej. sedantes y miorelajantes) y que paralelamente sean menos propensas a desarrollar tolerancia o dependencia. Consecuentemente, la clase de compuestos que poseen menor *eficacia* que los agonistas totales (entendida como acción máxima a saturación del receptor) y que compiten por el receptor atenuando las acciones del agonista total, se los conoce como **agonistas parciales** (Gardner, 1988; Potokar y Nutt, 1994). Ellos presentan un perfil dual de actividad agonista y antagonista (Rovati y Nicosia, 1994). Aunque pueden ocupar la totalidad de los sitios receptores, tienen insuficiente *actividad intrínseca* (expresada como la tasa entre el complejo receptor ligando activado con respecto al total) que determina la fuerza de la respuesta bioquímica o farmacológica (Facklam y col, 1992a y b). Estos compuestos son incapaces de provocar sedación, aún a dosis saturantes y necesitan mayor proporción de ocupación del receptor para producir anticonvulsión (Facklam, 1992a; Potier y col, 1988). Ejemplos de agonistas parciales del RCBZD son: bretazenil, imidazenil (BZD), abecarnil, ZK 91296 (β carbolina), CGS 9896, CGS 9895 entre otros. Un

claro panorama del agonismo parcial del bretazenil, demuestra que no altera sustancialmente el flujo de Cl^- estimulado por GABA, no cambia el número de RCBZD luego de su administración crónica y que la interrupción del tratamiento no conlleva a efectos rebotes (Schoch y col, 1992).

Ciertamente no se han demostrado cambios en la sensibilidad o número de RCBZD seguida a exposición prolongada de BZD, por lo que no es posible explicar de esta forma el fenómeno del que subyace la dependencia (File y Andrews, 1992). Sin embargo la administración crónica de BZD altera la sensibilidad de GABA en ciertas zonas cerebrales, disminuye la afinidad del receptor por GABA y desacopla el mecanismo alostérico de los sitios de unión de BZD y GABA, correlacionándose la expresión de estos cambios con la eficacia del agonista, de allí que se postule que los agonistas parciales poseen menor riesgo de producir tolerancia y dependencia física (Hernandez y col, 1989).

Otra estrategia para lograr acciones más específicas es el desarrollo de fármacos con selectividad hacia ciertos **subtipos de receptores** asociados a determinados efectos farmacológicos. Sobre esta base, se sugiere que el receptor BZD1 media acciones ansiolíticas y el BZD2 las sedativas; queda claro que esta aproximación es extremadamente simplista pues las diferentes poblaciones de receptores GABA_A/BZD con diferentes efectos farmacológicos parece ser más que la expresada como BZD1y BZD2 (Potokar y Nutt, 1994).

Ciertas diferencias en la respuesta farmacológica entre subtipos de receptores está documentada (Doble y Martin, 1992; Luddens y Wisden, 1991). Datos conductuales confirman que existen diferencias en el curso temporal para desarrollar tolerancia a efectos sedativos, miorelajantes, anticonvulsivantes o ansiolíticos (Rosenberg y Chiu, 1985; File, 1990). Los cambios que ocurren luego del tratamiento crónico pueden afectar sólo a determinados subtipos de receptores en determinadas áreas cerebrales asociadas con los "inputs" neurales (Gallager y Wilson, 1988; Gallager y Tallman, 1989; Olsen y Tobin, 1990). En consecuencia, resultaría óptimo activar sitios receptores que medien los efectos ansiolíticos que no se encuentren asociados al desarrollo de tolerancia y dependencia (Doble y col, 1992; Stephens y col, 1992).

Se conocen también drogas que presentan selectividad a determinado subtipo de receptor y además se desempeñan como agonistas parciales del mismo. Es el caso del abecarnil y del alpidem, ambas no BZD (Potokar y Nutt, 1994).

Sumadas a las ideas de agonistas parciales o especificidad de subtipo de receptor como explicaciones de la menor eficacia de una droga, una tercera propuesta novedosa postula que puede considerarse además la interacción de un agonista total con dos receptores que medien efectos opuestos (Rovati y Niclosia, 1994).

Como conclusión, todas estas alternativas se enfocan hacia el desarrollo de nuevas drogas con alta potencia que carezcan de efectos secundarios y adversos para el tratamiento de desórdenes específicos psicoafectivos y neurobiológicos como la ansiedad.

Existen ligandos endógenos del receptor a BZD?

Dada la evolutiva conservación del RCBZD, una interpretación seleccionista propondría un adaptativo rol funcional. La naturaleza, por cierto, no previno la síntesis de las BZD, por lo que fue razonable plantear la existencia de ligandos endógenos del receptor. Los criterios para ser así considerados incluyen ser compuestos que existan en el sistema nervioso central en concentraciones apropiadas para ocupar una proporción significativa de sitios, estar localizados en vesículas en las zonas donde se encuentra el receptor, unirse a él en forma competitiva y selectiva y mimetizar los efectos moduladores sobre el canal de Cl^- ocasionados por las BZD.

Varias sustancias con propiedades agonistas sobre el RCBZD fueron extraídas del cerebro y otros tejidos, entre ellas purinas y nucleótidos de purina (Asano y Spector, 1979; Skolnick y col, 1978), pero su baja afinidad por el receptor hace improbable su rol modulador fisiológico.

Se han postulado como moduladores inversos a moléculas peptídicas (inhibidor de la unión del diazepam DBI, endozepinas EP) aisladas de cerebros de rata, vaca o humano (Guidotti y col, 1983) que no poseen secuencias secretorias y cuya expresión no está confinada al CNS. Su afinidad por el RCBZD es baja y resulta más atractiva su interacción con el receptor periférico a BZD (Anholt y col, 1986).

El aislamiento de la n-butiril- β -carbolina-3-carboxilato (β CCB) de corteza cerebral, argumenta ser un potente agonista inverso endógeno con propiedades ansiogénicas y proconvulsivantes, que aumenta en la corteza de animales sometidos a estrés agudo (Medina y col, 1983a y b; Novas y col, 1988; Peña y col, 1986).

Con la finalidad de "pescar" ligandos al RCBZD, el grupo de De Blas desarrolló un anticuerpo monoclonal hacia las BZD. Inmovilizándolo en una columna se logró aislar N-desmetildiazepam del cerebro bovino (Sangameswaran y col, 1986). Posteriormente varios autores confirman la existencia de BZD (diazepam, N-desmetildiazepam, lorazepam) en cerebro y tejidos de animales, leche de vaca, leche y plasma humanos y líquido cerebroespinal (Basile y col, 1991; Medina y col, 1988; Olasmaa y col, 1990; Peña y col, 1991;

Unselid y col, 1989). Incluso se detectó inmunorreactividad en cerebros conservados en parafina desde el año 1940, 17 años antes de que se sintetizaran por primera vez las BZD (De Blas y col, 1987, Sangameswaran y col, 1986).

La inmunorreactividad se encuentra localizada en neuronas (Sanchez y col, 1991), existe una distribución cerebral regional (Wolfman y col, 1991) y el estudio de la localización subcelular revela su presencia en vesículas sinápticas (Medina y col, 1988).

¿Cuál es el origen de estas moléculas? Dos hipótesis no excluyentes pueden considerarse:

- son biosintetizadas total o parcialmente por el organismo,
- son incorporadas con la dieta.

La alternativa de síntesis por el organismo está avalada por la producción de BZD por células de glioma en neuroblastoma, crecidas en medio libre de suero (De Blas y col, 1987); por la presencia (respecto a controles a 0° C) de moléculas que reconocen al monoclonal en tejido cerebral in vitro incubado en atmósfera de carbógeno y suplementado con aminoácidos pertinentes (Piva y col, 1991); por la incorporación de aminoácidos marcados (inyectados intracerebroventricular) a moléculas que reconocen al monoclonal en experimentos "in vivo" (Medina y col, 1993); tanto como la habilidad del rumen bovino de aumentar la cantidad de estas moléculas cuando es incubado con homogenatos de forrages (Medina y col, 1991) que probablemente es el resultado de la actividad microbiana sobre precursores aportados por el vegetal.

La idea que las BZD endógenas provienen de fuentes alimenticias fue testeada en una serie de plantas y comidas, a saber: leche de vaca, trigo, papa, lentejas, maíz, cerezas, etc (Medina y col, 1988; Klotz, 1991; Unselid y col, 1989; Wildman y col, 1988).

Estas evidencias demuestran que el origen de las BZD endógenas puede ser diverso y la concentración reportada en tejidos o alcanzada luego del consumo por la dieta, puede revestir importancia farmacológica debido a la compartimentalización y a la acumulación de las mismas (Medina y col, 1993).

La carga endógena de BZD o ligandos al receptor podrían mediar efectos modulatorios sobre el almacenamiento de memorias (Izquierdo y Medina, 1992), influir sobre el grado de ansiedad del individuo o probablemente ser responsables del desorden neuropsiquiátrico observado en pacientes con encefalopatía, quienes tienen significativamente aumentadas las BZD endógenas en el plasma y líquido cefalorraquídeo (Basile y col, 1991).

Debido al uso de ciertas plantas como "infusiones traquilizantes" en la medicina folklórica, Medina y col (1989) exploraron la presencia de BZD o moléculas que se unieran al RCBZD como los responsables de dicha actividad. En *Tilia spp* y en la *Passiflora coerulea* se

encontraron moléculas que reconocen al anticuerpo monoclonal anti BZD y se unen al RCBZD, pero además en ellas y otras plantas estudiadas (entre las que se incluye la *Valeriana officinalis*) se evidenció la presencia de sustancias que se unen al receptor pero no reconocen al anticuerpo (Medina y col, 1989).

En este contexto se conocen agonistas naturales del RCBZD: el biflavonoide amentoflavona posee una alta afinidad ($K_i=6nM$) y fue aislado de una tintura alcohólica comercial usada para combatir la ansiedad y la epilepsia (Nielsen y col, 1988). Otra molécula, del tipo de la tanshinonas, llamada miltirona, fue aislada de la *Salvia miltiorhiza*, su afinidad por el RCBZD es moderada ($IC_{50}= 0.3-36 \mu M$) y su inhibición mixta. En estudios conductuales en animales, posee efectos ansiolíticos pero no sedativos, postulándose como un agonista parcial (Lee y col, 1991).

Productos naturales y su utilidad en la búsqueda de drogas

En los párrafos anteriores, se comentó la existencia de BZD o ligandos al RCBZD en alimentos de origen diverso.

La búsqueda de compuestos biológicamente activos a partir de fuentes naturales, reviste actual interés, estimándose por ej., que el 56% de los compuestos terapéuticos del Formulario Nacional Británico son moléculas naturales o derivados de ellas (Midgley, 1988) o que se comercializan 120 drogas aisladas de plantas con flor o helechos que representan el 25% de las prescripciones anuales en América de Norte (Cox y Balick, 1994).

Las estrategias que se emplean para encarar la búsqueda de moléculas naturales activas comprenden: el reconocimiento etnobotánico, quimiotaxonómico, investigaciones basadas en ecología química o el testeo masivo e indiscriminado de compuestos o extractos en diversos ensayos biológicos (Waterman, 1990 y 1993).

El material biológico para investigación es casi ilimitado; si sólo tomamos en consideración el reino vegetal, se dispone de millones de especies (Waterman, 1993). En términos financieros es imposible evaluar tal diversidad. Holland (1994) propone que el testeo azaroso es una aproximación inefectiva en el descubrimiento de drogas. Resulta necesario, entonces, algún criterio de selección.

La ruta etnobotánica estudia las relaciones entre las plantas y la gente. Los trabajos de campo exploran el uso medicinal de plantas gracias a la valiosa colaboración de la sabiduría popular regional. Los investigadores se remiten a zonas con amplia diversidad vegetal, de sociedades asentadas por años que transmiten su conocimiento folklórico consuetudinariamente (Cos y Balick, 1994). Muchos y de gran importancia fueron los

hallazgos utilizando este sistema de estudio, algunas de las drogas así descubiertas se muestran en la tabla 1.

TABLA N° 1: DROGAS DESCUBIERTAS MEDIANTE LA RUTA ETNOBOTÁNICA.

DROGAS	USO MEDICO	PLANTA DE ORIGEN
Aspirina	Reduce el dolor y la inflamación	<i>Filipendula ulmaria</i>
Codeína	Reduce el dolor y suprime la tos	<i>Papaver somniferum</i>
Ipecac	Induce vómitos	<i>Psychotria ipecacuanha</i>
Pilocarpina	Reduce la presión ocular	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Quinina	Combate la malaria	<i>Cinchona pubescens</i>
Reserpina	Reduce la presión sanguínea	<i>Rawolfia serpentina</i>
Teofilina	Descongestiona los bronquios	<i>Camelia sinensis</i>
Vinblastina	Combate enfermedad de Hodgkin's	<i>Catharanthus roseus</i>
Flavanona	Antiinflamatorio	<i>Erythrina variegata</i>
Prostratina	Antiviral	<i>Homalanthus mutans</i>
Forskolina	Desórdenes cardíacos	<i>Coleus forskolii</i>
Pulegona	Abortivo	<i>Mentha Pulegium L.</i>
Digoxina	Cardiotónica	<i>Digitalis lanata</i>
Morfina	Analgésica	<i>Papaver somniferum</i>

No obstante, la dilucidación de los principios activos desde el material de partida es una tarea ardua y por lo general esta búsqueda se torna engorrosa. En la práctica resulta frecuente que en las sucesivas purificaciones ocurra la pérdida de la actividad observada en los pasos iniciales. Posibles explicaciones contemplan la falta de suficientes cantidades de la sustancia, fruto de la baja eficiencia en su aislamiento, o efectos provocados por la acción conjunta de dos o más moléculas, que al disecarlas carecen de actividad (De Feudis, 1991).

Numerosas son las publicaciones que reportan efectos sobre el sistema nervioso central, pero en su gran mayoría sólo reportan efectos centrales utilizando extractos o fracciones muy impuras. Este hecho representa una seria limitación para una correcta evaluación de los principios activos responsables de dichas acciones (Ver tabla 2).

TABLA N° 2: EFECTOS SOBRE EL SNC DE EXTRACTOS VEGETALES

FUENTE	EFECTOS FARMACOLOGICOS	CITAS
<i>Ginkgo biloba</i> (hojas)	Cambia el nivel cerebral de aminas biógenas. Disminuye los niveles de prolactina y hormona de crecimiento en sangre. Favorece la memoria, evita el estrés y reduce el tiempo de sueño.	Petkov y col, 1993 Wada y col, 1993
<i>Valeriana officinalis</i> (raíz)	Acción sedativa. Disminuye la locomoción, aumenta el tiempo de sueño y es anticonvulsivante. Se ha demostrado su unión al receptor central de GABA.	Leuschner y col, 1993 Mennini y col, 1992
<i>Passiflora incarnata</i> (material aéreo)	Disminuye la locomoción y las convulsiones, aumenta el tiempo de sueño y el umbral nociceptivo.	Speroni y Minghetti, 1988
<i>Chamomilla recutita</i> (flores)	Reduce la motilidad y la exploración, sin dificultar la coordinación motora y aumenta el tiempo de sueño.	Della Loggia, 1992
<i>Eschscholzia californica</i> (material aéreo)	Ansiolítico a dosis bajas. Sedativo a altas dosis (reduce exploración y locomoción).	Rolland y col, 1991
<i>Pluchea indica</i> (raíz)	Acción depresiva central (reduce la exploración, locomoción y coordinación muscular, aumenta el tiempo de sueño).	Sen y Chaudhuri, 1992
<i>Syzygium cuminii L</i> (semillas)	Acción depresiva sobre el SNC. Suprime condicionamientos evitatorios.	Chakraborty y col, 1985
<i>Mikania cordata</i> (Burm) (raíz)	Acción depresiva sobre el SNC. Supresión del comportamiento agresivo y de respuestas a condicionamientos evitatorios.	Bhattacharya y col, 1988
<i>Isochrysis galbana</i> <i>Himanthalia elongata</i> (algas)	Produce hipotermia, ataxia, reduce la actividad motora y la exploración.	Laguna y col, 1992 Anca , 1992

Nuestra búsqueda de sustancias naturales con efectos tranquilizantes se pensó acorde al conocimiento folklórico autóctono (etnofarmacología) y se valió de ensayos bioquímicos y conductuales que permitieron evidenciar las acciones biológicas. El testeo comenzó desde extractos vegetales crudos y se continuó la purificación, guiada por los ensayos bioquímicos principalmente, hasta que se aisló la(s)molécula(s) con las propiedades observadas. De esta forma se identificó una familia de ligandos al RCBZD con ciertas acciones farmacológicas propias de las BZD. Estas moléculas naturales forman parte de una familia de compuestos denominados **flavonoides**.

Flavonoides: un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en plantas.

Los flavonoides son el grupo de moléculas derivadas de la estructura del anillo fenilcromano (fig 3).

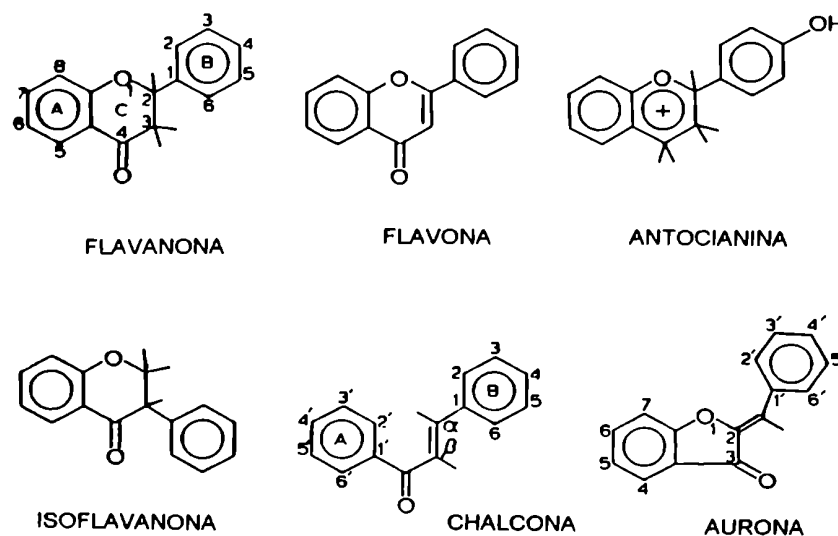


FIG 3

Pueden ser agrupados de acuerdo a patrones de sustituciones de los anillos y grado de saturación del anillo benzopirona. De este modo se clasifican en: flavanonas, flavonas, isoflavanonas, antocianinas, chalconas y auronas, cada una de las cuales presenta varias familias de derivados hidroxilados, metoxilados o glicosilados que a su vez pueden polimerizarse (biflavonoides, oligoflavonoides).

En general son compuestos de bajo peso molecular (entre 200-400D), algunos lipofílicos y otros hidrofílicos. Son sustancias ampliamente distribuidas en las plantas y en su forma aglicosilada se ubican frecuentemente en glándulas secretorias de aceite y capas epicuticulares.

Se estima que consumimos 1g de flavonoides en nuestra dieta diaria; se encuentran incluidos en: frutas, vegetales, granos, nueces, té, vino, cerveza, entre otros productos, así como constituyen los ingredientes activos en plantas de uso folklórico medicinal.

Su presencia en las plantas (en composiciones cualitativas y cuantitativas características según las especies) les confiere innumerables beneficios (Harborne y Grayer, 1993). Las defiende del ataque por pestes y hongos, inhibe la germinación de esporas y retrasa el crecimiento larvario, lo que los capacita como útiles insecticidas inocuos para el hombre. Son señales secretorias en zonas de rápido crecimiento radicular y pueden provocar inducción o represión génica para la nodulación en rhizobium.

Son, además, los responsables de la pigmentación floral, con un espectro de absorción entre 240-380 nm, confiriendo tonalidades amarillas que atrae a la polinización y estimula la alimentación de insectos. Sirven para atraer o repeler a determinados huéspedes. Ellos los almacenan en sus alas, para emitir señales de reconocimiento, y se postula que los utilizan como agentes antivirales y antibióticos.

Lo anteriormente citado, indica que los flavonoides son agentes biológicos tanto para las plantas como para los insectos. Su espectro de acción bioquímica, celular y farmacológica en los mamíferos merece ser considerada (Cody y col, 1987; Harborne, 1993), a saber:

- afectan in vitro la actividad enzimática, inhibiendo la histidina decarboxilasa, DOPA decarboxilasa, lactico deshidrogenasa, piruvato quinasa, catecol-o-metiltransferasa, aldosa ciclasa, polimerasa del RNA y DNA, topoisomerasas, transcriptasa reversa, lipooxigenasa y ciclooxigenasa, calcio calmodulina, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (Ruckstuhl y col, 1979), adenosina deaminasa (Koch y col, 1992), etc.
- modulan las funciones celulares inmunes e inflamatorias; poseen efectos inmunosupresores, inhibiendo la proliferación de células T, la secreción de interleuquina 2 y de inmunoglobulinas G, M y A mitógenamente estimuladas; deprime la expresión de antígenos de histocompatibilidad tipo II y la actividad de linfocitos citotóxicos. Inhiben la secreción de histamina por los mastocitos y la exocitosis de enzimas lisosomales por los neutrófilos y reducen procesos inflamatorios por evitar la agregación plaquetaria.
- poseen acción antiespasmódica, antitóxica, hepatoprotectiva y antiviral (Barnard, 1993).
- presentan efectos endócrinos, tales como inhibición de la secreción de la hormona del crecimiento y antagonismo del receptor a estrógenos.

- tienen efectos inhibitorios sobre la peroxidación lipídica (antioxidantes) y la producción de radicales libres. Son moléculas que capturan radicales libres, pues presentan reactividad con los grupos aromáticos y también con ciertos cationes.
- provocan mutagenicidad en bacterias y fibroblastos de hamster, pero no parecen ser mutagénicos en mamíferos in vivo.
- sus efectos anticancerígenos son reportados por la mayoría de los estudios, inhibiendo eventos químicos relacionados con la promoción tumoral; inducen la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF), aumentan la producción de interferón y la función de las células natural killer.

Todas estas acciones, generalmente provocadas en rangos μM bajos, los hacen efectivos en el tratamiento del asma, alergias, inflamaciones, artritis, cáncer, tumores, aterosclerosis, hepatotoxicidad, intoxicaciones por metales, afecciones virales, hepáticas, bacterianas etc, etc.

Sin embargo tal enumeración de efectos terapéuticos no involucró acciones sobre el SNC. Lo registrado en este aspecto es muy limitado. Se conoce sólo su acción analgésica vía receptores opiáceos y sus efectos antidepresivos mediante la inhibición de la enzima mono amino oxidasa (MAO) (Anton, 1988).

Los resultados presentados en este trabajo de tesis permiten adicionar información sobre un aspecto novedoso de estas moléculas naturales. Los flavonoides constituyen una nueva familia de ligandos al RCBZD y a través de él disminuyen la ansiedad sin evidenciar sedación ni miorrelajación, lo cual resulta atractivo en la búsqueda de una medicina alternativa en el tratamiento de la ansiedad.

OBJETIVOS

Reconocer e identificar los principios responsables de la acción "tranquilizante" atribuida a algunas plantas de uso medicinal folklórico, a saber: *Passiflora coerulea*, *Matricaria recutita*, *Tilia tomentosa* y *Salvia guaranitica*.

Para tal fin se realizó la purificación de moléculas guiada por ensayos de unión al RCBZD (sitio principal de acción de drogas ansiolíticas) y se caracterizaron bioquímica y farmacológicamente los compuestos activos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Ensayos de extracción, purificación e identificación:

Las diferentes especies vegetales utilizadas en el presente trabajo de tesis doctoral, fueron obtenidas en herboristerías locales y su identificación fue realizada en el Museo de Botánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, a cargo de su director el Dr. J.L. Amarin.

Las particularidades del protocolo de extracciones con solventes orgánicos, de las plantas previamente procesadas en forma mecánica, son detalladas en cada capítulo.

Los pasos de purificación incluyen cromatografías de distribución en contracorriente (CCD) en un aparato automático con capacidad para 10 ml en cada fase. El sistema de solventes utilizado es benzeno:cloroformo:metanol:agua (2:1:2.3:0.7vol/vol) o similar, siendo la cantidad de transferencias especificadas en cada caso en particular.

Las fracciones bioquímicamente activas, fueron posteriormente sometidas a fraccionamientos en diferentes sistemas de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa, convenientemente seleccionados. Se utilizó un cromatógrafo LKB Pharmacia modelo 2150/2152 para corridas analíticas y un ISCO modelo 2350, adaptado para eluciones con altos flujos, para corridas semipreparativas o preparativas. Las columnas usadas fueron C₁₈ preparativas (2.2cm x 25cm y partículas de 5µm), C₁₈ semipreparativa (1cm x 25cm y partículas de 5µm), C₁₈ analíticas (0.46cm x 25cm y partículas de 5µm) o C₄ analíticas de Hesperia, CA, USA. Los solventes de elución fueron gradientes de acetonitrilo o metanol/propanol en agua y el tiempo de duración y el flujo de la corrida se detalla en cada caso en particular. La detección fue usualmente hecha a 280 nm.

La identificación de los compuestos por espectrometría de masa fue obtenida con un Shimadzu GC-MS-QP 1000 operado en el modo EI. El voltaje ionizante fue de 70 eV y la corriente de 60 µA. La tasa de muestreo fue de 1 década/seg y el rango de 50-500 unidades de masa atómica. Los datos se analizaron y el patrón de intensidades iónicas fue comparado con compuestos estándar de referencia.

Ensayos bioquímicos de unión al RCBZD:

Se realizaron para determinar el efecto de los diversos flavonoides sobre el desplazamiento de la unión específica de ^3H Flunitrazepam (^3H FNZ) al RCBZD, según los diseños experimentales explicados más abajo.

Fueron utilizadas membranas sinaptosomales crudas de corteza cerebral bovina lavadas exhaustivamente. Cada ensayo se realizó por triplicado y se utilizó una concentración de proteína de 0.3 mg en 1ml de solución tampón Tris-HCl 25 mM a pH 7.3. La incubación se realizó a 4°C durante 60 min en presencia de ^3H FNZ. En todos los casos la unión no específica se determinó en presencia de 3 μM de FNZ, realizándose para todas las concentraciones utilizadas de ligando marcado radioactivamente y representó menos del 10% de la unión total. El ensayo finalizó por filtración a través de filtros Whatman GF/B y se realizaron 3 lavados de 3 ml cada uno con el medio de incubación. Los filtros se secaron y la radioactividad fue contada en un contador líquido de centelleo Tracor luego del agregado de 5 ml de líquido centellante (2,5-difeniloxazol PPO-xileno) (Medina y col, 1990).

Determinación de la IC_{50} y de la K_i :

Se define IC_{50} como la concentración del inhibidor (en este caso los diferentes flavonoides) capaz de desplazar el 50% de la unión del ligando marcado (Yamamura y col, 1985).

Para determinarla se fijó una concentración de ^3H FNZ (0.7 nM) y se varió la del compuesto inhibidor en un rango de entre 10nM y 100 μM . Graficando el porcentaje de unión específica de ^3H FNZ en función del log de la concentración del flavonoide, la IC_{50} corresponde a la concentración del inhibidor que inhibe el 50% de la unión total.

Para determinar la K_i (constante de inhibición) se procede según la ecuación:

$$\text{K}_i = \text{IC}_{50} / (1 + (F/\text{K}_d))$$

donde F= concentración utilizada del ligando marcado,

K_d = constante de disociación del ligando marcado.

Curvas de saturación:

Para estudiar la saturación de la unión de ^3H FNZ en presencia o ausencia del compuesto flavonoide, se utilizó un rango de entre 0.3 a 10 nM de ^3H FNZ y se fijó una concentración del flavonoide (10 μM).

El gráfico de porcentaje de marca específica en función del ligando marcado, puede linealizarse usando la transformación de Scatchard. La recta obtenida luego de graficar la marca unida específicamente/la concentración de ^3H FNZ libre versus la marca unida específicamente, da información acerca de dos parámetros:

- a) sitios máximos de unión ($B_{\text{máx}}$), en la intersección con las abcisas,
- b) constante de disociación para ^3H FNZ (K_d), calculada como la inversa de la pendiente obtenida.

En los ensayos realizados en presencia de una concentración fija del flavonoide, se analizó si dichos parámetros se modificaron. De esta forma se reconoce una interacción competitiva con el RCBZD cuando ocurren cambios en la K_d y no en la $B_{\text{máx}}$, no competitiva si cambia la $B_{\text{máx}}$ y no la K_d y una interacción mixta si cambian ambos.

Los ensayos de unión específica a receptores α y β adrenérgicos (Medina y col, 1984), colinérgicos muscarínicos (Jerusalinsky y col, 1983) y GABA A (Medina y col, 1990) se realizaron según técnicas desarrolladas en el laboratorio.

Drogas:

Los flavonoides o los extractos utilizados en los ensayos de unión al RCBZD fueron disueltos en buffer:etanol (1:1), con una cantidad de dimetilsulfóxido que no excede el 1% del volumen final del ensayo y gotas de KOH que no modifican significativamente el pH de la preparación sinaptosomal de las membranas cerebrales.

El flunitrazepam se disolvió en etanol.

Experimentos de flujo de $^{36}\text{Cl}^-$:

La técnica se desarrolló con modificaciones según los trabajos de Harris y Allan, 1985; Oja y col, 1990; Facklam y col, 1992 y Schoch y col, 1992. Se utilizaron ratas Wistar macho de 250g, se decapitaron y removieron inmediatamente los cerebros. Un

cerebro se homogeneizó (vidrio/vidrio) a mano (12 veces) en 30 ml de solución tampón A (NaCl 145mM, KCl 5mM, MgCl₂ 4mM, KH₂PO₄ 1mM, HEPES 10mM y ATP 2mM a pH 7.5) y se filtró por gravedad a través de una red de nylon de 100µm. Se centrifugó a 2750 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se homogeneizó en 30 ml de solución tampón B (NaCl 45mM, KCl 100mM, MgCl₂ 4mM, KH₂PO₄ 1mM, HEPES 10mM, ATP 2mM a pH 7.5), se realizó otro ciclo de centrifugación y el pellet fue nuevamente homogeneizado en solución A.

El pellet final se resuspendió en 4.5 ml de solución A que contiene sero albúmina bovina(0.025%) y dimetilsulfoóxido (0.025%), para lograr una concentración estandarizada de aproximadamente 1.2 mg de proteína por cada 200µl de solución.

Los sinaptoneurosomas así obtenidos se incubaron con los diferentes flavonoides en ausencia o en presencia del antagonista específico, Ro15-1788, o con el vehículo de disolución, a 30°C durante 10 min y luego se adicionaron 200µl de solución A que contiene 0.23µCi de ³⁶Cl⁻ preparado con o sin GABA 12µM.

La reacción finalizó a los 3 segundos por el agregado de 4 ml de solución A que contiene además 0.01% seroalbúmina bovina y 60 mg/l de picrotoxina (bloqueante del canal de Cl⁻) y filtración individual por filtros Whatman GF/C preincubados por 10 min con 0.01% de polietilenimina. Se realizan dos lavados más al tubo y otro al filtro. Los filtros fueron secados en estufa a 70°C durante 1 hora. La radioactividad en los filtros fue contada luego de agregar 5 ml de hidrófluor.

Drogas:

Los flavonoides utilizados en los ensayos de flujo de ³⁶Cl⁻ fueron disueltos en una solución alcalina de KOH que no modifica el pH final del medio de incubación. El antagonista específico del RCBZD, Ro 15-1788, se disolvió en etanol.

Tests farmacológicos:**Actividad locomotora:****Objetivo:**

Medir la actividad locomotora.

Aparato:

Consiste en una caja de vidrio de 35 x 15 x 20 cm. El aparato (OPTO Varimex mini) detecta los movimientos del ratón y registra la actividad locomotora ambulatoria mediante la interrupción del haz de luz generado por las celdas fotoeléctricas (son 15 y están espaciadas cada 2.65 cm) que se distribuyen en los laterales del instrumental. El diámetro de cada celda es de 0.32 cm (fig 4).

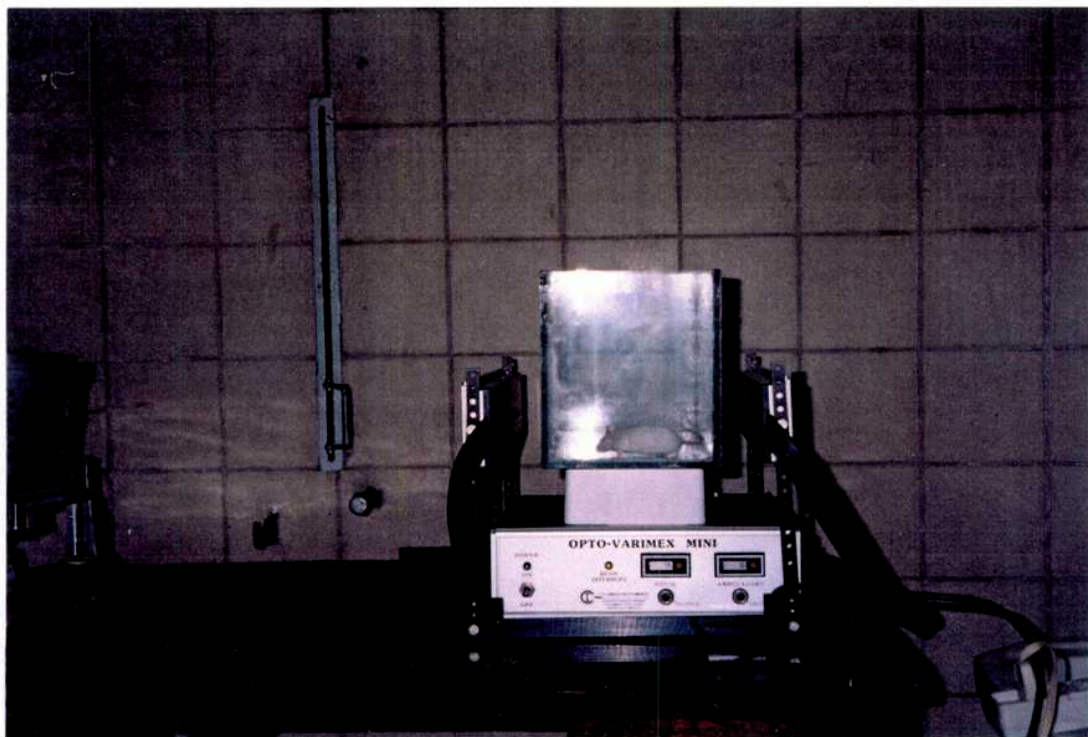


FIG 4

Procedimiento:

Se inyectaron ratones (30-35 g) intraperitonealmente (ip) con droga o vehículo y luego de 20 minutos se los colocó individualmente en la caja. Se testearon durante 5 minutos

registrando la actividad locomotora ambulatoria a través de las interrupciones al haz de luz.

Laberinto en cruz elevado:

Objetivo:

Evaluar efectos ansiolíticos y/o ansiogénicos sobre la actividad exploratoria.

Una droga ansiolítica aumentará selectivamente la exploración en las ramas abiertas sin un equivalente aumento en las cerradas. Una droga ansiogénica actúa de modo inverso (Pellow y col., 1985). Un incremento en el tiempo pasado en las ramas abiertas identifica un efecto ansiolítico (Pellow y File, 1986 a).

Aparato:

Consiste en dos ramas abiertas de 20 x 5 cm y dos cerradas de 20 x 5 x 35 cm con el techo descubierto, dispuestas de forma perpendicular (fig 5). Se encuentra elevado a una altura de 50 cm del suelo, lo que aumenta la natural aversión del animal a los espacios abiertos. Se ilumina uniformemente con luz roja tenue.



FIG 5

Procedimiento:

Cada ratón (30-35 g) fue inyectado ip con vehículo o droga y regresado a su jaula. Luego de 20 min se lo ubicó en el centro del aparato y se testea durante 5 minutos. Se midieron:

- a) número de entradas a las ramas abiertas,
- b) número de entradas totales,
- c) tiempo que transcurre en las ramas abiertas.

Antagonismo con RO 15-1788:**Objetivo:**

El RO 15-1788, a bajas dosis, es un antagonista específico del RCBZD (File y Pellow, 1986a; File y Pellow, 1986 b). Se lo utiliza para verificar si el efecto observado por las drogas a testear es mediado por el RCBZD, puesto que al administrarlo previo a la misma anula todo tipo de respuesta ocasionada vía RCBZD.

Procedimiento:

Se inyectaron ratones de aproximadamente 30 g con RO 15-1788 en dosis de 3 mg/kg. Al cabo de 10 min se administró el flavonoide o el vehículo ip. Luego de 20 min se realizó la medición (File y Pellow, 1986 a; Gherezghiher y Lal, 1982).

Experimentos crónicos:**Objetivo:**

Evaluar si con la administración prolongada de apigenina se conserva el efecto ansiolítico observado en el laberinto en cruz elevado por la administración aguda de la droga.

Procedimiento con inyecciones intraperitoneales:

Se realizaron inyecciones ip diarias, en horarios estipulados (11 hs), de 3 mg/kg de apigenina o vehículo a ratones macho de 30-35 g, durante 7 días. El día del testeo se administró la misma dosis y se registraron luego de 20 min los parámetros correspondientes en el Opto Varimex y en el laberinto durante 5 min.

Si el efecto ansiolítico persiste luego del tratamiento prolongado, la droga no ha desarrollado mecanismos de tolerancia (Higgitt y col, 1988).

Procedimiento con administración subcutánea continua:

Se implantaron subcutáneamente minibombas osmóticas (ALZET) en ratones macho de 30g de peso. Para tal fin se los anestesió con hidrato de cloral al 12%, se realizó una

incisión en la piel entre la escápula, se separó el tejido conectivo y se colocó la bomba en el bolsillo formado. Se suturó y administró antibiótico local e intramuscular..

Las minibombas fueron llenadas con apigenina o solución vehículo compatible con el material de la cápsula (agua destilada pH 13). Se calculó la concentración para entregar 10 mg/kg /día de la droga ; considerando que la bomba tiene un flujo de 0.5µl/hora y una duración de 14 días. Cumplido el plazo se testearon los ratones en el OPTO Varimex y en el laberinto.

"Hole board" (Campo abierto con agujeros):

Objetivo:

Medir la actividad exploratoria.

Un aumento en la actividad exploratoria implica un incremento en el número de veces que el ratón introduce la cabeza en los agujeros (head dips), el tiempo que permanece con la cabeza en ellos y en el número de rearings (postura en la que el animal se para sobre sus dos patas traseras). La disminución de estos parámetros con respecto al control indica efecto sedativo (File y Pellow, 1985 a).

Aparato:

Es una caja de madera de 60 x 60 x 30 cm con 4 agujeros de 2 cm de diámetro espaciados equidistantes en el suelo de la caja (fig 6). En dos de los mismos se colocó comida (pellets) con el fin de motivar la exploración. Se ilumina la caja con luz roja tenue.



FIG 6

Procedimiento:

Se inyectan ratones (30-35 g) ip con droga o vehículo y luego de 20 min se los coloca individualmente en el centro del aparato. Se testearon durante 5 min y se registraron:

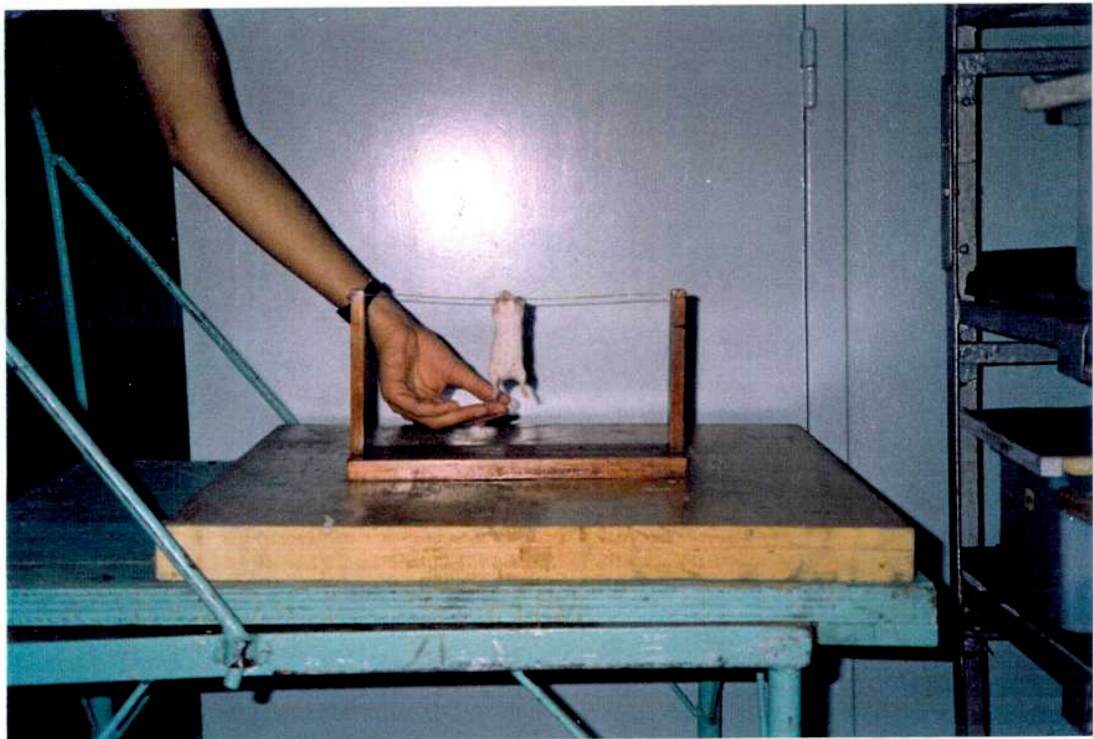
- a) número de exploraciones a los agujeros (head dips),
- b) tiempo de exploración a los agujeros,
- c) número de rearings.

Test del alambre:**Objetivo:**

Medir el tonismo muscular.

Aparato:

Es un soporte que posee a 15 cm de altura un alambre de 1 mm de diámetro y 28 cm de largo dispuesto horizontalmente (Bonetti y col., 1982) (fig 7) .

**FIG 7**

Procedimiento:

Se realizaron dos sesiones previas de entrenamiento con intervalo de 5 min. Consistieron en colocar al ratón en el centro del alambre permitiendo que se agarre por sus patas delanteras, descartando aquellos que no consiguen sostenerse por los menos durante 5 segundos con una pata. Luego se inyectó ip con vehículo o droga y a los 20 min se testeó. Se determinó el número de animales que no cumplen con el criterio anterior.

Prevención de convulsiones:**Objetivo:**

Observar la prevención de convulsiones tónico-clónicas inducidas por pentilinetrazol (PTZ).

Procedimiento:

Ratones adultos de aproximadamente 30 g fueron inyectados con PTZ a una dosis convulsivante de 50 mg/kg. El flavonoide fue administrado con 15 min de anterioridad por vía ip o intracerebroventricular (icv). Los ratones controles recibieron el vehículo. Los animales fueron regresados a sus jaulas luego de la inyección de PTZ.

Se clasificó la intensidad de las convulsiones según Zhang y col. (1989) correspondiendo a:

0= no convulsiona

1= "jerks" (sacudones y/o respingos)

2= convulsión clónica (pequeñas flexiones rápidas localizadas en miembros y/o cabeza y/o cuerpo)

3= extensión tónico-clónica (extensión forzada del tren trasero, seguida o no de la muerte)

La latencia entre la inyección y el inicio del primer "jerk", clonus o tonus fue medida en segundos.

Potenciación de la inducción del sueño:**Objetivo:**

Cuantificar el poder hipnótico, observando si la administración de las drogas logra "dormir " a los ratones previamente sometidos a una dosis subumbral de pentobarbital sódico.

Procedimiento:

Se inyectaron ip ratones machos de 30-35g de peso con las diferentes fracciones de *Salvia guaranítica* o con la solución vehículo, luego de 20 min se les administró ip pentobarbital sódico en una dosis subhipnótica (25 mg/kg). Luego de 20 min se testeó si el animal estaba "dormido". Esto habitualmente se evidencia por la pérdida del reflejo de enderezamiento (Anca y col, 1992; Wada y col, 1993), pero a pesar que los animales tratados "dormían" en sus jaulas, seguían siendo reactivos al reflejo de enderezamiento.

Se decidió, entonces, cuantificar la actividad locomotora durante 5 minutos con el propósito de observar si el medioambiente novedoso estimulaba la exploración. Los animales inyectados con vehículo se movieron libremente por la caja; contrariamente una marcada disminución de la actividad locomotora fue observada en los ratones tratados.

Todos los experimentos conductuales fueron realizados con ratones machos Swiss de aproximadamente 2 meses y medio de edad y 30 -35 g de peso. Ellos permanecieron en el bioterio dispuestos en jaulas de 10 animales y en condiciones controladas de comida y bebida (ad libitum) y ritmo luz-oscuridad (12-12hs).

Se dispone de un cuarto conductual aislado, ambientado con ventilación, calefacción e iluminación adecuadas. Se colocó a los animales en sus jaulas el día anterior al testeó para adaptarlos al lugar y se realizaron las mediciones entre las 11 y 14 horas.

Es aconsejable trabajar con un suave ruido de base ambiental, para disminuir el estrés de los animales y es importante que el observador se ubique a distancia del aparato de registro para evitar cualquier influencia sobre el desempeño de los animales.

De no ser especificado, las inyecciones se realizaron por la vía ip y el volumen administrado fue de 0.15 ml para un ratón de 30g.

Para realizar las inyecciones intracerebrentricular (icv) se anestesió ligeramente a los ratones, se realizó una incisión en la cabeza para exponer el bregma (unión de la sutura coronal y sagital) y se realizó una presión firme con una aguja sobre la calota a 1.5 mm de la sutura sagital y 1mm de la coronal, de 3.5 mm de profundidad (Noble y col, 1967, modificado para ratón).

Drogas:

Los extractos y flavonoides ensayados se solubilizaron en 20-30% de dimetilsulfóxido, 30% de agua alcalina (KOH 1M) y se llevaron a volumen con agua destilada, controlando el pH a un valor no superior a 8 con HCl. Las concentraciones superiores a 10 mg/kg de los flavonoides, requirieron de 10% de etanol y/o 10%

propilenglicol, lográndose suspensiones muy finas y homogéneas. Los diferentes vehículos utilizados no afectaron el comportamiento control de los animales, registrándose valores "históricos".

El diazepam, la benzodiazepina de referencia, se disolvió en dimetilsulfóxido al 30%.

El antagonista específico del RCBZD, Ro 15-1788, se solubilizó en 15% de dimetilsulfóxido, 10% de propilenglicol, llevando a volumen con agua destilada.

El pentobarbital sódico y el pentilenetrazol fueron disueltos en agua destilada.

Test para el tratamiento estadístico:

Para los tests de "hole board" y del laberinto en cruz elevado se realizó un análisis de varianza, sobre cada uno de los parámetros registrados, con el tratamiento de la droga como único factor. Luego se empleó el test de Dunnett a dos colas para comparar los diferentes tratamientos respecto de los valores controles.

En el caso de la actividad locomotora se usó el test estadístico no paramétrico de Mann Whitney o el test de Dunn's que compara las medianas con sus intercuartiles entre un par de grupos experimentales.

Los tests de Kurskall Wallis y de Mann Whitney se utilizaron para analizar la significación de los datos en el test de prevención de convulsiones y en el test del alambre.

El test de Student se utilizó para evidenciar cambios significativos entre las medias de dos grupos experimentales.

CAPITULO I**CRISINA, UN FLAVONOIDE AISLADO DE *PASSIFLORA COERULEA*,****QUE RECONOCE AL RECEPTOR CENTRAL A LAS BZD****Y POSEE EFECTOS ANSIOLITICOS**

RESULTADOS

Ciertas especies de *Passiflora* fueron utilizadas por sus efectos sedativos (Speroni y Minghetti, 1988). La *Passiflora incarnata* se emplea para combatir insomnios y neuralgias. Más recientemente se encontró que sus extractos crudos eran capaces de prolongar el sueño, disminuir la actividad locomotora y evitar convulsiones (Speroni y Minghetti, 1988). A pesar de que se han identificado de la *Passiflora incarnata* varios flavonoides, alcaloides y derivados de terpenos, los productos activos responsables de las propiedades neurofarmacológicas no están reconocidos.

El siguiente estudio está dirigido a aislar productos activos a partir de una especie relacionada, la *Passiflora coerulea*, basándonos en la información previa de que ella posee ligandos al RCBZD (Medina y col, 1989), hipotéticos moduladores de efectos sobre el SNC.

Aislamiento e identificación de crisina:

Ramas secas de *Passiflora coerulea* fueron procesadas mecánicamente y 120g del polvo resultante fue extraído por 18 hs con 1.5 l de diclorometano en un aparato Soxhlet. Se concentró y secó el extracto por rotavapor. Se realizó una extracción etanólica, la cual se evaporó a sequedad y se sometió a una distribución en contracorriente (CCD). Se analizó en diferentes puntos de la cromatografía la actividad del material en ensayos de desplazamiento de ^3H Flunitrazepam (FNZ) al RCBZD. En la fig 8 se observa que sustancias con bajo o alto coeficiente de partición, en este sistema, son inactivas. Dos grupos de sustancias activas fueron detectadas y se las denominó A y B .

El posterior fraccionamiento del grupo B fue infructuoso debido a la escasa cantidad de material. El grupo A fue purificado en sucesivos pasos de HPLC (fig 9).

En el cromatograma A, dos grupos de sustancias activas fueron detectadas. El primero reconoció al anticuerpo monoclonal desarrollado hacia las BZD, indicando la presencia de compuestos simil BZD, que no pudieron ser identificados hasta la fecha. El segundo grupo fue procesado como se muestra en los cromatogramas B,C,D y E de la fig 9. El pico puro en E fue identificado por espectrometría de masa como crisina (5,7 di OH flavona) (fig 10).

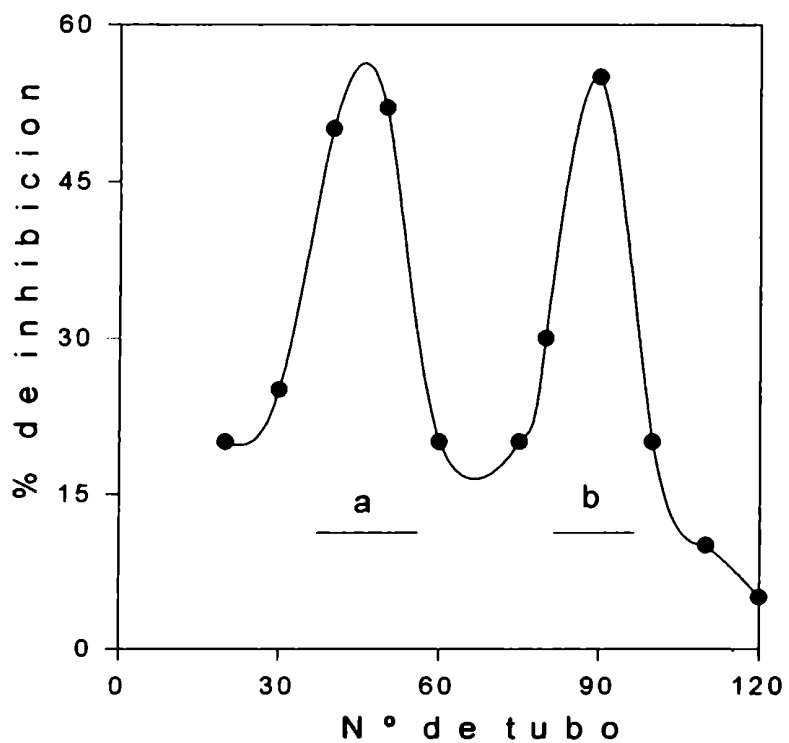


FIG 8: Patrón de inhibición de la unión de ^3H Flu a membranas de corteza de vaca, por diferentes fracciones del extracto de *Passiflora coerulea* (ver texto) obtenidas en las 120 transferencias realizadas en un sistema de CCD benzeno, cloroformo, metanol, agua (2, 1, 2.3, 0.7, v/v). Las barras indican donde se encuentran los componentes de mayor actividad.

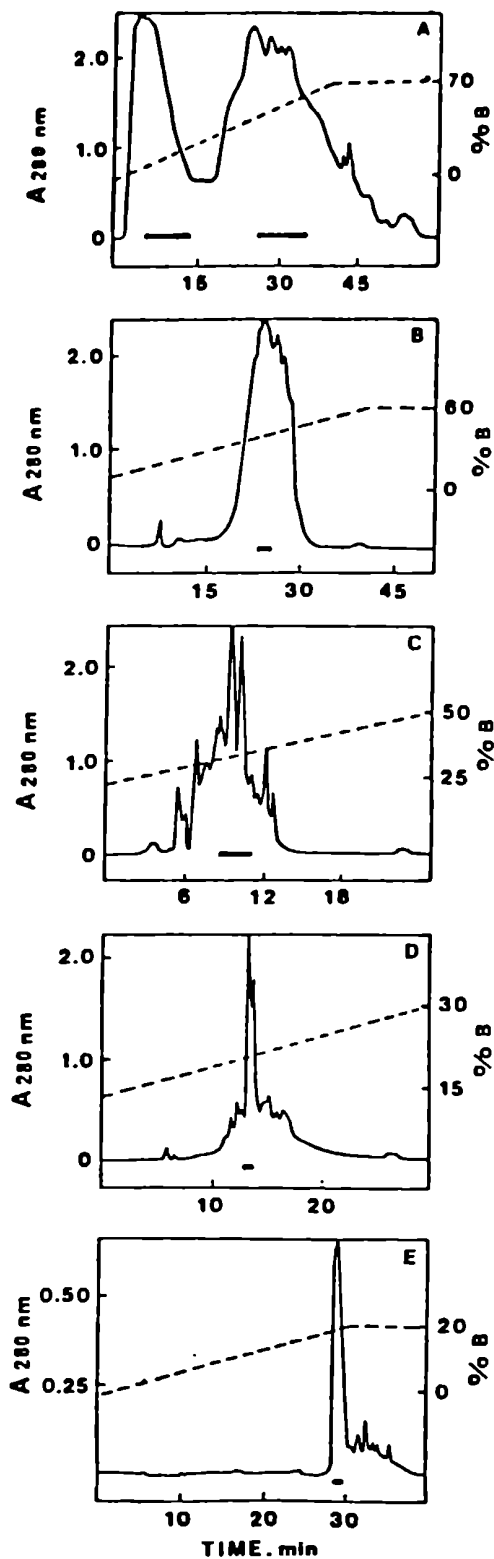


FIG 9: Sucesivos pasos de HPLC usados para purificar el grupo A (fig 8). Los cromatogramas fueron realizados en una columna preparativa de fase reversa C₁₈, eluida con un gradiente de n-propanol en 50% metanol. El solvente B fue n-propanol. Las barras indican la distribución de los componentes activos. En A el primer grupo (que eluye entre 5-15 min) contiene compuestos detectados por el anticuerpo hacia las BZD y el segundo grupo (que eluye entre 25-35 min) fue el que se sometió a sucesivos pasos de HPLC, como se muestra en B, C, D y E con los gradientes indicados. En cada paso se fracciona el material activo previo. El material del principal pico en E se usó para el análisis de espectrometría de masa.

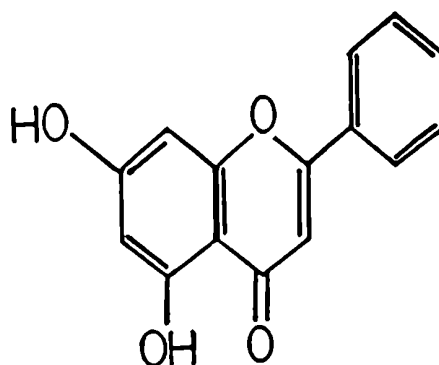
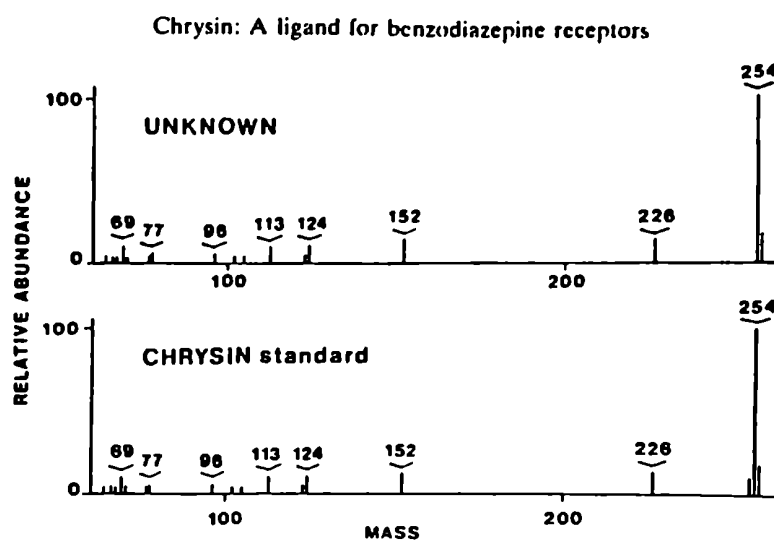


FIG 10: Identificación por espectrometría de masa de crisina en el pico E de la fig 9.
Parte inferior: estructura química de la 5-7 di OH flavona (crisina).

Se comprobó, además, que la crisina auténtica presenta el mismo tiempo de retención en HPLC que el pico aislado en E (fig 9).

Ensayos de unión con radioligandos.

Crisina inhibe la unión de ^3H FNZ a membranas de corteza cerebral de vaca, lavadas repetidas veces, con una constante de inhibición $K_i = 3\mu\text{M}$ ($n=4$). El análisis por Scatchard de curvas de saturación reveló una interacción competitiva con un aumento de la constante de disociación (K_d) sin modificación del número máximo de sitios ($B_{\text{máx}}$) (fig 11). Contrariamente, en el RBZD periférico, el desplazamiento de la unión de ^3H Ro 5-4864 a membranas de riñón fue de tipo mixto con una $K_i = 13\mu\text{M}$.

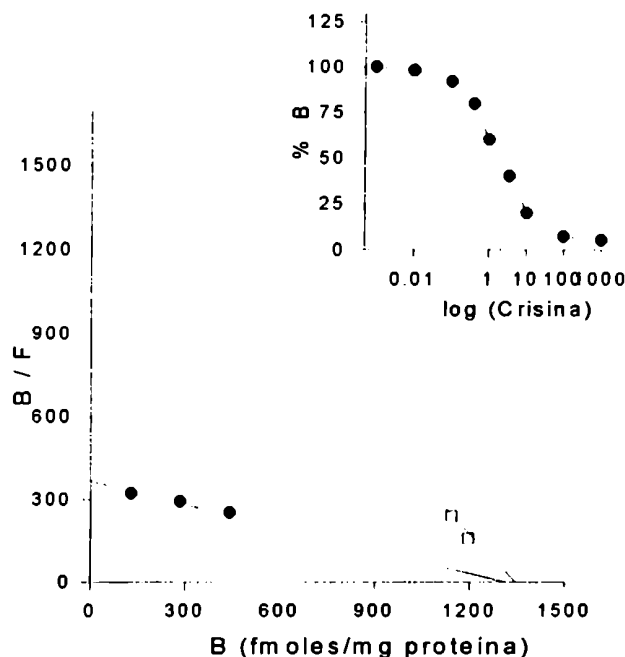


FIG 11: Gráfico de Scatchard de la unión de ^3H FNZ (0.3 a 10 nM) a membranas sinaptosomales de corteza cerebral de vaca, lavadas repetidas veces, en ausencia (□) o en presencia de crisina (●).

Inserto: curva de desplazamiento de la unión de ^3H FNZ por crisina.

Para determinar si crisina podía reconocer a receptores de otros sistemas de neurotransmisión, se realizaron ensayos de desplazamiento de radioligandos. Crisina $10\mu\text{M}$ no inhibió la unión de ^3H prazosin, ^3H dihidroalprenolol, ^3H quinuclidinil benzilato o ^3H muscimol a receptores α,β adrenérgicos, muscarínicos o GABA A respectivamente ($n=3$, datos no mostrados).

Medición del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de corteza de rata.

Se registró la modulación de crisina ($20\mu\text{M}$) del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ ($0.23\mu\text{Ci}$) estimulado por $12\mu\text{M}$ de GABA. En seis experimentos realizados por cuadruplicado no se observaron cambios en el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en los sinaptoneurosomas (fig 12). Ello indica que la crisina no modula el pasaje de este ión posibilitado por la presencia de GABA.

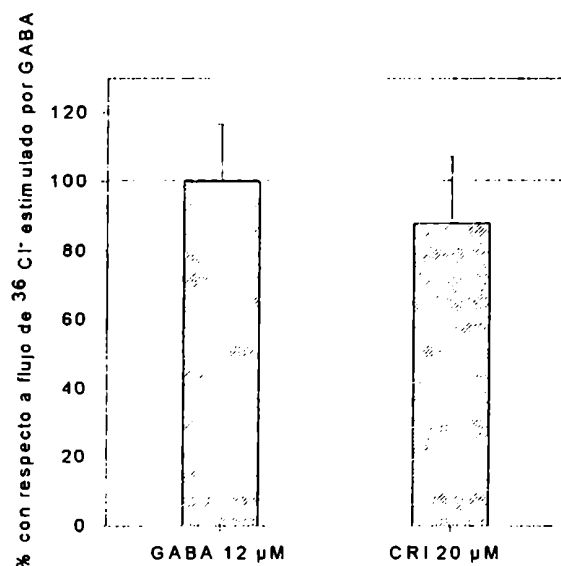


FIG 12: Efecto de crisina en el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de corteza de rata. Se indica la modulación por crisina ($20\mu\text{M}$) del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ estimulado por GABA ($12\mu\text{M}$). Los resultados se expresan en forma relativa al valor de la estimulación (que representa un 32% respecto al grupo control). Los sinaptoneurosomas ($1.2\text{ mg proteína/tubo}$) fueron preincubados a 30°C durante 10 min en presencia de crisina, luego se adiciona $0.23\mu\text{Ci}$ de $^{36}\text{Cl}^-/\text{tubo}$ y se detiene la reacción a los 3 segundos. Los % se calculan a partir de las medias \pm ES de 6 experimentos realizados por cuadruplicado. No existen diferencias significativas, test de Student; $T(0.05, 2) = 0.509$.

Efectos farmacológicos de la crisina

Para estudiar el perfil farmacológico de la crisina (así como de los otros compuestos) se validó la batería de tests conductuales mediante el uso de diazepam (benzodiazepina clásica) como droga de referencia.

Test de actividad locomotora

El perfil farmacológico típico del diazepam mostró una curva en U invertida donde se obtuvo la máxima actividad locomotora en dosis intraperitoneales (ip) de 0.6 y 1 mg/kg ($p < 0.002$), siendo la dosis de 0.3 mg/kg baja para lograr la acción y la de 3 mg/kg suficientemente alta para comenzar a insinuar un estado de sedación caracterizado por un decremento en la actividad locomotora (fig 13).

La crisina provocó un aumento de la actividad locomotora de modo equipotente con el diazepam (0.6 mg/kg, $p < 0.02$ y 1mg/kg, $p < 0.05$) (fig 13).

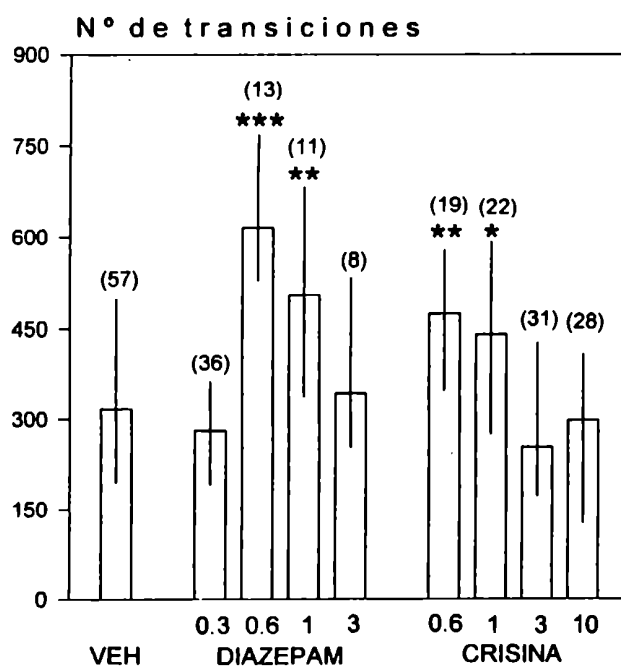


FIG 13: Medición de la actividad locomotora de ratones expresada por el N° de transiciones al haz de luz de las células fotoeléctricas (medias \pm intercuartiles) registradas durante 5 min, luego de 20 min de la inyección ip de vehículo (VEH), diazepam (DZ) o crisina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.002$; test de Mann Whitney.

Test del laberinto en cruz elevado.

Se evidenció un aumento en el porcentaje de entradas en las ramas abiertas y en el porcentaje de tiempo pasado en las mismas cuando se administró diazepam a bajas dosis (0.3 y 0.6 mg/kg, $p < 0.01$). Estos resultados son compatibles con el efecto ansiolítico conocido del diazepam. Crisina 1 mg/kg provocó también un incremento en ambos parámetros ($p < 0.01$) (fig 14).

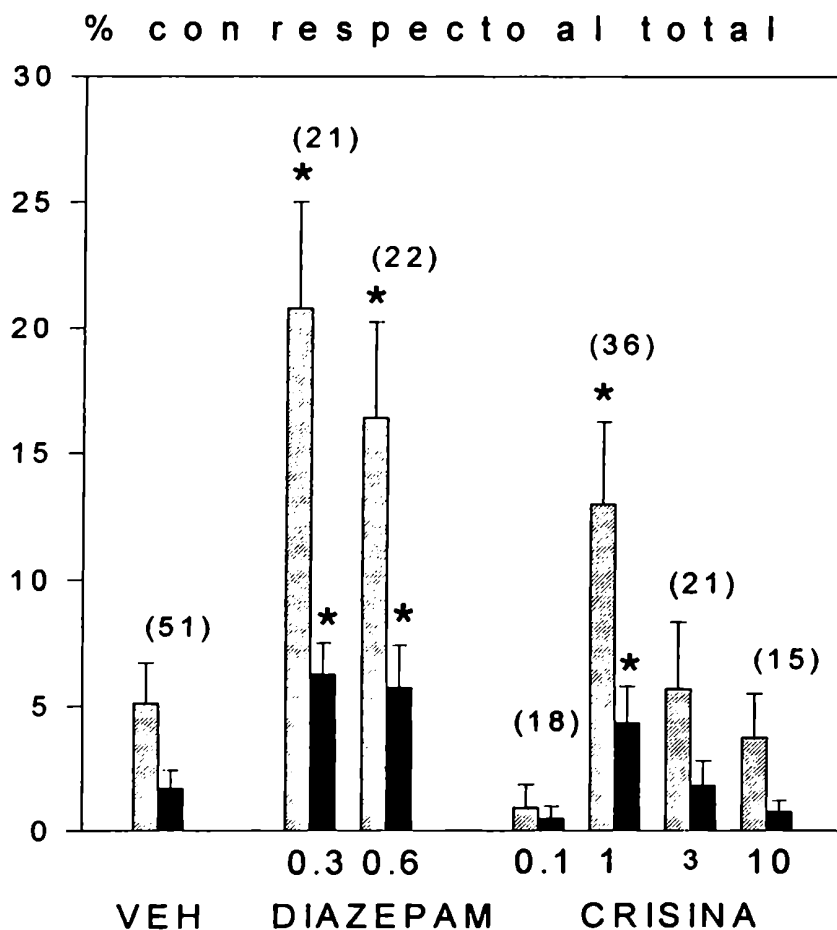


FIG 14: Media \pm ES del porcentaje de entradas a las ramas abiertas (barras rayadas) y porcentaje de tiempo (segundos) de permanencia en ellas (barras negras), registradas durante 5 min en el test del laberinto en cruz elevado, luego de 20 min de la inyección ip a ratones de vehículo (VEH), diazepam o crisina. * $p < 0.01$ significativamente diferente del control, test de Dunnett, luego de ANOVA.

No se observaron diferencias en el número total de ramas exploradas (tabla 3).

TABLA Nº 3: NUMERO DE ENTRADAS TOTALES A LAS RAMAS DEL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO, LUEGO DE 20 min DE LA INYECCION IP.

Droga (mg/kg)	n	Entradas totales (medias \pm ES)
VEH	53	8.7 \pm 0.6
DIAZEPAM		
0.3	21	10.5 \pm 0.8
0.6	22	12.4 \pm 1.9
CRISINA		
1	36	9.9 \pm 0.8
3	21	8.7 \pm 1.1
10	15	10.2 \pm 1.1

El efecto de la crisina 1mg/kg en el aumento del número de entradas a las ramas abiertas y el tiempo de permanencia en ellas, fue bloqueado por la administración previa de Ro 15-1788, un antagonista específico del RCBZD (fig 15).

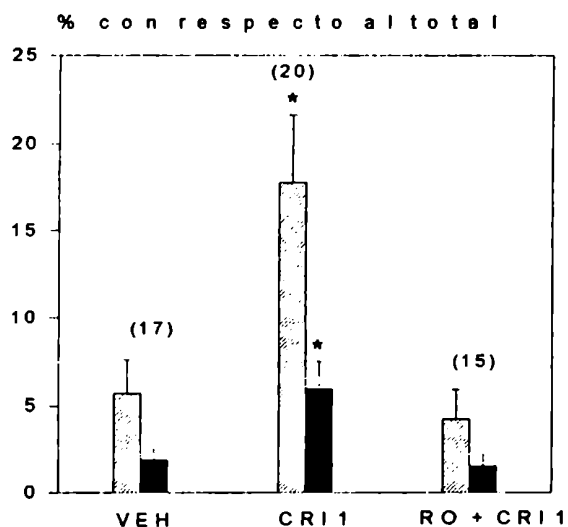


FIG 15: Media \pm ES del porcentaje de entradas a las ramas abiertas (barras rayadas) y del porcentaje de tiempo en las mismas (barras negras), en 5 min en el test del laberinto en cruz elevado, luego de 20 min de la inyección ip a ratones de vehículo (VEH), crisina (1 mg/kg) o Ro 15-1788 (3 mg/kg) administrado 10 min antes de crisina (1 mg/kg). * $p < 0.01$, test de Dunnett. No hubo diferencias en el Nº total de ramas exploradas; $F(2,49) = 3.18$.

Test de "holeboard".

Confirmando previos reportes, el diazepam aumentó el número de veces que el ratón explora los agujeros del piso, cuando es administrado en dosis de 0.3 mg/kg ($p < 0.05$) y aumenta el tiempo de dicha exploración a dosis de 1 mg/kg ($p < 0.01$). Al incrementar la dosis de diazepam (6 mg/kg) los efectos son opuestos y la disminución observada en ambos parámetros evidencia la acción sedativa ($p < 0.01$) (fig 16).

Crisina provocó un aumento significativo del tiempo de exploración a los agujeros a la dosis de 3 mg/kg ($p < 0.01$), pero no fue capaz de provocar sedación hasta la mayor dosis ensayada de 10 mg/kg (fig 16).

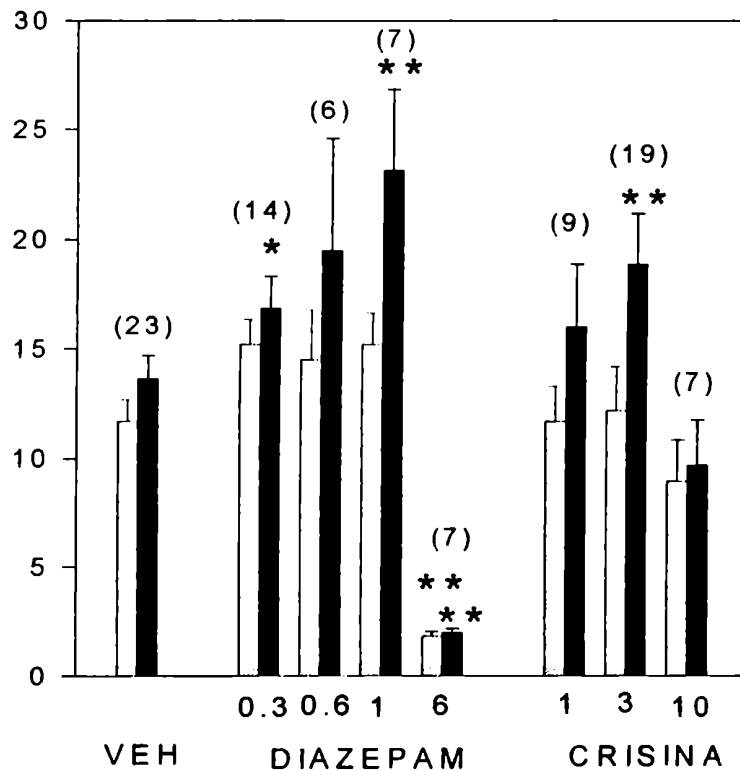


FIG 16: Media \pm ES del N° de exploraciones a los agujeros (barras rayadas) y tiempo (segundos) que permanecen los ratones con la cabeza en ellos (barras negras), en 5 min en el test de "hole board", luego de 20 min de la inyección ip de vehículo (VEH), diazepam o crisina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, test de Dunnett.

Test del alambre.

Como se observa en la figura 17, la totalidad de los ratones controles permanecieron tomados del alambre por sus patas delanteras. La inyección de 3 mg/kg de diazepam no perjudicó la ejecución control aunque los animales presentaban un estado de hipotonicidad y colgaban laxamente del alambre. Cuando se duplicó la dosis (6 mg/kg) más del 70% de los ratones fallaron en la realización de la tarea.

En todas las concentraciones testeadas (0.6 a 30 mg/kg), crisina no modificó la capacidad de los animales para sujetarse correctamente (fig 17).

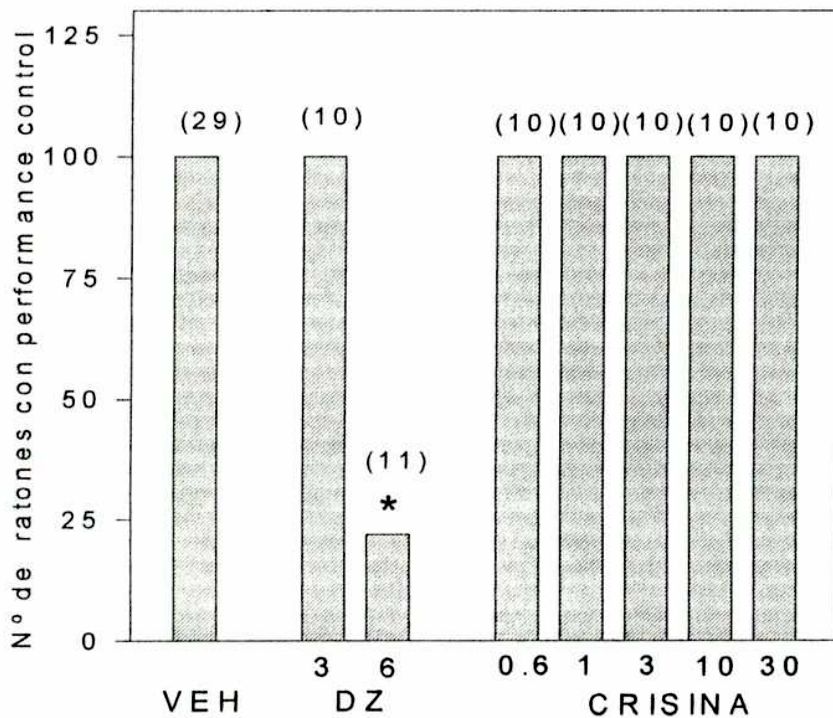


FIG 17: Porcentaje del número de ratones que pueden permanecer tomados del alambre por lo menos durante 5 segundos, luego de 20 min de la inyección ip de vehículo (VEH), diazepam (DZ) o crisina. * $p < 0.01$, test dde Kruskall Wallis.

Test de prevención de convulsiones ocasionadas por pentilnetetrazol.

La inyección ip de crisina en dosis de 3 a 30 mg/kg no produjo resultados consistentes. En cambio la microinyección intracerebroventricular (icv) de crisina en dosis de 40µM mostró un significativo efecto anticonvulsivante ($p < 0.02$) (tabla 4). Este efecto se manifestó en la reducción del número de ratones que presentaron convulsiones tónico-clónicas más que en la latencia para producirlas. Como se muestra en la tabla 4, la administración previa del antagonista específico del RCBZD, Ro 15-1788, bloquea la acción de la crisina. Además se observó que los ratones inyectados icv con esta dosis de crisina perdieron el reflejo de enderezamiento conservado en los animales controles.

TABLA N° 4: EFECTO DE LA INYECCION ICV DE CRISINA (40 µM) Y CRISINA + RO 15-1788 (3 mg/kg) SOBRE LAS CONVULSIONES CAUSADAS POR PENTILENETETRAZOL (50 mg/kg).

	n	No convulsión	Jerks	Convulsión clónica	Convulsión tónico-clónica
SALINA	15	0	0	6	9
CRISINA	17	7	6	3	1 *
RO 15-1788 + CRISINA	7	0	0	1	6

* $P < 0.02$, significativamente diferente al score salino, test de Kruskall Wallis.

DISCUSION

Varios compuestos activos fueron detectados en extractos de *Passiflora coerulea* L (Paris y Moyse, 1981), sin embargo hasta el momento ninguno ha sido identificado. Una especie emparentada, la *Passiflora incarnata*, es conocida y utilizada por sus acciones sedativas. Experimentos realizados con el material proveniente de una extracción etanólica, evidenciaron la capacidad para aumentar el umbral nociceptivo, retrasar el inicio de convulsiones, aumentar el tiempo de sueño y disminuir la actividad locomotora. Una purificación parcial posterior indicó que dicha actividad se conservó principalmente en la fracción que no contiene al grupo de los flavonoides, consecuentemente se los excluye como responsables de estos efectos (Speroni y Minghetti, 1987).

En un trabajo previo del laboratorio se reportó la presencia de ligandos al RCBZD en diversas plantas de uso medicinal folklórico (Medina y col, 1989). El detallado análisis sobre la *Passiflora coerulea* permitió purificar e identificar un compuesto natural (la 5-7 diOH flavona) que no es una BZD, pero comparte algunas de sus características como se mostró en la fig 11. Los efectos de este flavonoide, conocido como crisina, han sido testeados en diversos experimentos bioquímicos. Se reportó su acción antiinflamatoria probablemente relacionada con la inhibición de la liberación de histamina de los mastocitos (Pearce y col, 1984; Anton, 1988), su eficacia en reducir la respuesta plaquetaria desencadenada por la prostaciclina (Landolfi y col, 1984), y en dispersar los trombos adheridos al endotelio vascular, sumado a la capacidad para captar radicales libres y proteger la degradación del factor de relajación endotélico (Grygleski y col, 1987).

En esta tesis se caracterizó la acción de la crisina desde un enfoque diferente, no incursionado hasta el momento, evidenciando sus efectos sobre el sistema nervioso central. Como se mostró en la fig 4, la crisina es un monoflavonoide que se une de modo competitivo al RCBZD con una afinidad moderada ($K_i=3\mu\text{M}$). Los receptores periféricos son menos afines por la crisina y el desplazamiento de la unión presenta un mecanismo mixto. Por otra parte, este compuesto, no reconoció ninguno de los otros tipos de receptores ensayados (adrenérgicos, muscarínicos o gabaérgicos), lo cual indica cierto grado de selectividad. Es decir, la crisina es el primer ejemplo reportado de monoflavonoide que se une competitiva y selectivamente al RCBZD provocando una acción farmacológica. Los estudios realizados en esta tesis permitieron reconocer y postular al grupo de los flavonoides como una nueva familia de ligandos al RCBZD con un ventajoso perfil terapéutico (ver discusión general).

Con el propósito de evidenciar si la unión al RCBZD modula el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ a través del complejo GABA_A , se realizaron experimentos en presencia de GABA. Crisina 20 μM no

modificó la conductancia al ión y en experimentos preliminares con dosis mayores (100 μM) tampoco se evidenciaron cambios. Las BZD clásicas (ej. diazepam, lorazepam, alprazolam) son agonistas totales del RCBZD y provocan un aumento en el flujo de Cl^- estimulado por GABA (Yu y col, 1988; Mehta y Ticku, 1989; Ngur y col, 1990; Facklam y col, 1992b; Schoch y col, 1992). Sin embargo un agonista parcial del receptor, llamado bretazenil, es un ansiolítico diez veces más potente que el diazepam, pero a diferencia de éste no altera significativamente el flujo de Cl^- estimulado por GABA (Schoch y col, 1992; Potokar y Nutt, 1994). Una posible explicación, en el terreno especulativo, sería que el aumento del ión se observara con ciertas dosis de drogas que sean capaces de provocar efectos depresores (ej. sedación), y quizá los fármacos selectivamente ansiolíticos no lo logren ni a altas concentraciones.

Conociendo las acciones farmacológicas que media el RCBZD (ver introducción), los tests conductuales fueron seleccionados para evidenciar si la droga en cuestión posee tales efectos. Los ensayos conductuales con ratones, demostraron que la inyección ip de crisina era efectiva en determinadas tareas.

Algunos autores sostienen que el comportamiento locomotor puede ser estimulado por ansiolíticos (Ahtee y Shillito, 1970; Sansone, 1978). Los resultados obtenidos con diazepam se corresponden con lo publicado en la bibliografía (File y Pellow, 1985b), observándose un aumento en la actividad locomotora a dosis bajas. Crisina en dosis equipotentes a las del diazepam, provocó un aumento en la locomoción ambulatoria.

Se utilizó la actividad exploratoria espontánea en un laberinto en cruz elevado para la medición de la ansiedad (Pellow y File 1986a y b). El aumento selectivo en la entrada a las ramas abiertas y el tiempo de permanencia en ellas, sugiere un efecto ansiolítico. Este test fue validado internamente con dosis bajas de diazepam, como se encuentra reportado (Pellow y col, 1985). Crisina en dosis de 1 mg/kg provocó un aumento en los parámetros registrados indicando su efecto ansiolítico que pudo ser bloqueado por la administración previa del antagonista específico del RCBZD Ro 15-1788 en dosis en las que no ejerce efecto propio (File y Pellow, 1986 a).

Los experimentos de prevención de convulsiones provocadas por pentilene-tetrazol son indicadores preliminares de la acción de drogas ansiolíticas en roedores (Hill y Tedeschi, 1971). Se observó efecto anticonvulsivante de crisina cuando es inyectada icv, lo cual sugiere que el efecto con la administración ip no se observa por no alcanzar la dosis efectiva en el cerebro. El bloqueo del RCBZD con el antagonista específico abolió el efecto anticonvulsivante, lo cual sugiere que dicho receptor está involucrado.

El test de "holeboard" posee un componente exploratorio representado por la inspección de los agujeros con la cabeza del animal y uno locomotor (File y Pellow, 1985 a). Es decir provee información independiente de la exploración y de la locomoción (Pellow y File, 1986b). Debido a que por razones de accesibilidad instrumental se registró individualmente la actividad locomotora, sólo se tomó en cuenta la actividad exploratoria. Un aumento en la misma en un medio ambiente nuevo se relaciona con un efecto antiansioso (Crawley y col., 1981).

Se conoce que el diazepam 1 mg/kg produce un incremento de las variables registradas en este test (File y Pellow, 1985b), en el presente trabajo pudo reproducirse dicho resultado, avalando su efecto ansiolítico. Sólo la administración de 3 mg/kg de crisina mostró un aumento en el tiempo de exploración. De todos modos este test es efectivo para evaluar conductas sedativas y la detección del efecto ansiolítico (por aumento de la exploración) es de baja sensibilidad.

Este test es sensible y específicamente usado para detectar sedación (File, 1985; Pellow y File, 1986b). Una disminución en los parámetros registrados sugiere efecto sedativo de un fármaco (File y Pellow, 1985a; File y Pellow, 1986c). Dosis de diazepam 10 veces mayores a las necesarias para calmar la ansiedad se requieren para causar una marcada sedación. Contrariamente al diazepam, ninguna de las dosis analizadas de crisina (1,3 y 10 mg/kg) ocasionó disminución de los parámetros medidos; en consecuencia no se evidenció un efecto sedativo.

Una conducta francamente sedativa suele estar acompañada de disminución en la locomoción y en el tono muscular. Ninguna dosis de crisina (hasta 30 mg/kg) causó miorelajación.

Estos resultados indican que a bajas dosis, ambos, diazepam y crisina tienen efectos ansiolíticos y a dosis altas sólo el diazepam es sedativo y miorelajante. La crisina muestra el perfil de un agonista parcial, capaz de retener ciertas acciones, pero incapaz de provocar otras (en este caso producir depresión del SNC).

La importancia de este trabajo radica en haber logrado asignarle una acción farmacológica a un compuesto puro y proponerlo como uno de los responsables del efecto tranquilizante del té de la pasionaria. Este avance contrasta con toda la información reportada, obtenida a partir de extractos crudos o parcialmente purificados, cuya farmacología probablemente responda a la acción conjunta, quizá sinérgica, de muchos componentes y donde el mecanismo de acción resulta incomprensible.

CAPITULO II

APIGENINA, UN ANSIOLITICO NATURAL

AISLADO DE LA *MATRICARIA RECUTITA*

RESULTADOS

En Europa, la manzanilla es una de las más antiguas e importantes plantas medicinales. Sorprendente es el listado de sus usos y su farmacología. Están reportadas acciones antiinflamatoria (Della Loggia y col, 1986), anticonvulsivante (Abdul-Ghani y col, 1987), antimicrobiana (Cinco y col, 1983), antiséptica, espasmolítica (Forster y col, 1980), antimicótica, antiherpética, diurética, expectorante, estimulante y tonificante.

Las prácticas folklóricas del consumo de tés medicinales, muestran que la manzanilla es utilizada como "tranquilizante". Della Loggia y col (1982) realizaron experimentos que demostraron el poder sedativo de extractos de *Matricaria recutita*.

Estos antecedentes despertaron nuestro interés en desarrollar un estudio detallado para evaluar la eficacia farmacológica de la *Matricaria recutita* sobre el SNC e identificar los compuestos responsables de la misma.

Aislamiento e identificación de la 5,7,4' trihidroxiflavona (apigenina):

Ramas y flores secas de *Matricaria recutita* fueron procesadas mecánicamente, se suspendieron los 100 g de polvo resultantes en 500 ml de agua; en esta proporción se dejó hervir durante 30 minutos y luego se filtró. Se liofilizó este extracto y se realizó una exhaustiva extracción con éter dietílico a pH 5. Se evaporó el material soluble en éter y se lo sometió a sucesivos pasos de cromatografía en HPLC.

La corrida en columna semipreparativa del extracto inicial, reveló la presencia de fracciones activas en desplazar la unión de ^3H FNZ a membranas sinaptosomales de corteza de vaca. Sólo tres de ellas lo hacen de modo competitivo. Fueron denominadas 1, 2 y 5 y presentaron un tiempo de retención de 29-35 min, 35-48 min y 56-66 min. (fig 18).

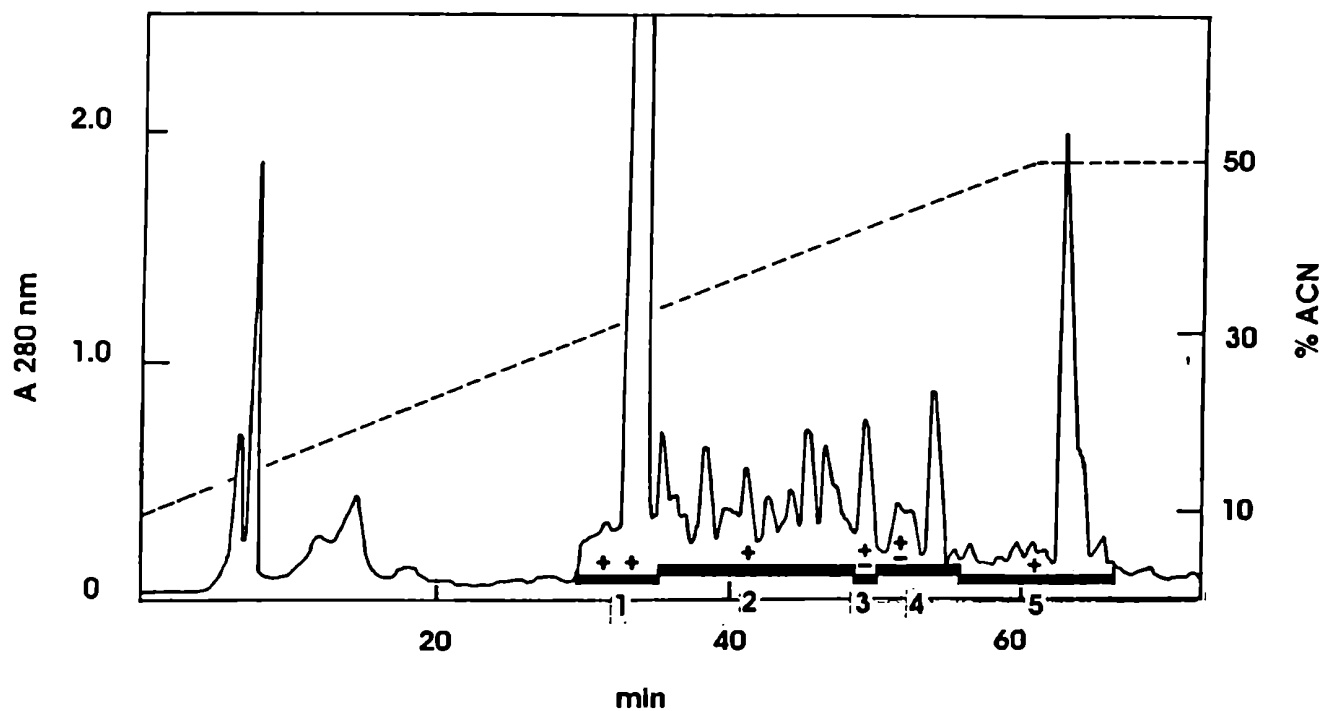


FIG 18: Cromatografía en HPLC del extracto acuoso-etéreo de ramas y flores de *Matricaria recutita* en una columna C₁₈. La elución fue realizada con un gradiente lineal de acetonitrilo (ACN) 10-50% en 60 min. Los signos + y - indican el grado de desplazamiento de dicha fracción a la unión de ³H FNZ. El material que eluyó antes de los 20 min era inactivo y fue descartado.

La fracción más hidrofílica (la número 1, que eluye aproximadamente con 30% ACN) fue la bioquímicamente más activa y la única que mostró tener efectos ansiolíticos, cuando se la ensayó en el test del laberinto en cruz elevado. La administración ip a ratones del equivalente a 0.5 g del material original, aumentó significativamente el tiempo de exploración de los animales a los espacios abiertos ($p < 0.01$) (fig 19).

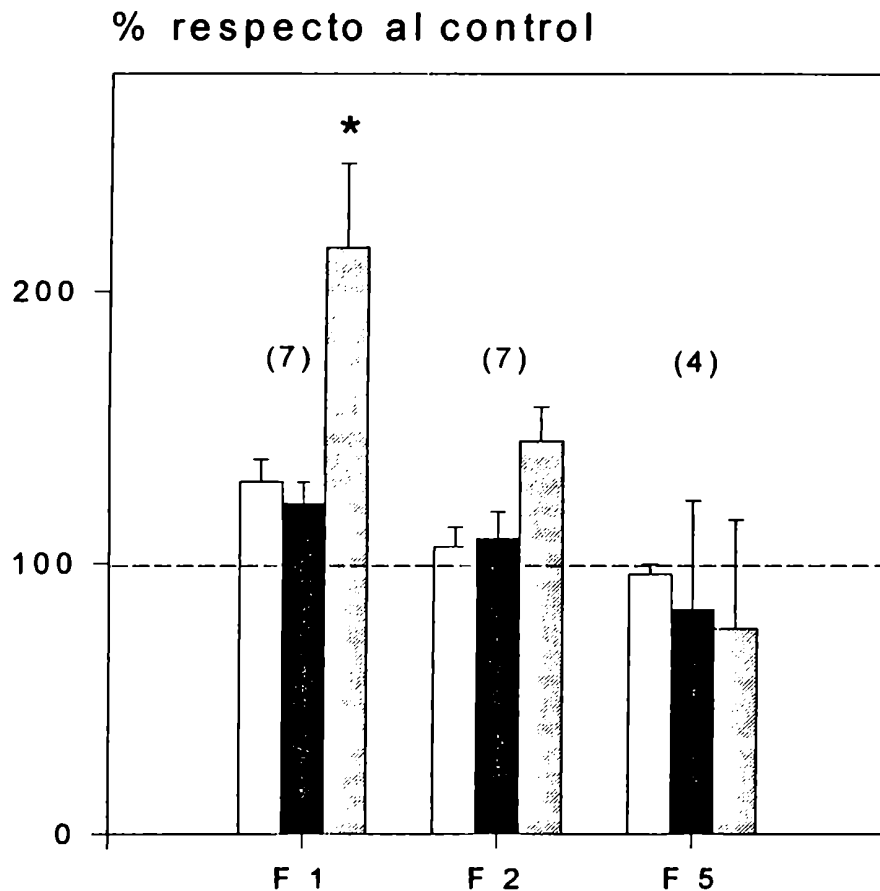


FIG 19: Comportamiento de los ratones en el test del laberinto en cruz elevado, 20 min después de recibir una inyección de vehículo (VEH), o de las diferentes fracciones (F 1, 2, 5) de la fig 18. Las dosis administradas corresponden a 0.5 g de planta original / ratón. Los resultados se expresan como porcentajes \pm ES respecto del control, del N° de entradas totales (barras blancas), % de entradas a las ramas abiertas (barras negras) y % de tiempo pasado en las ramas abiertas (barras rayadas).

* $p < 0.01$, test de Dunnett, luego de ANOVA. El número de ratones utilizados se indica ().

Con el propósito de identificar el principio activo de la fracción 1, un kilo de manzanilla fue procesado en columnas semipreparativas de HPLC. La fracción activa que eluye con el 30% de ACN fue posteriormente purificada mediante cromatografías analíticas de HPLC y el pico resultante (más del 90% de pureza) se lo identificó como apigenina por coelución cromatográfica con apigenina estándar. (fig 20).

Espectros UV y corridas en cromatografías en placa delgada (TLC) confirmaron la identificación del pico como apigenina (datos no mostrados).

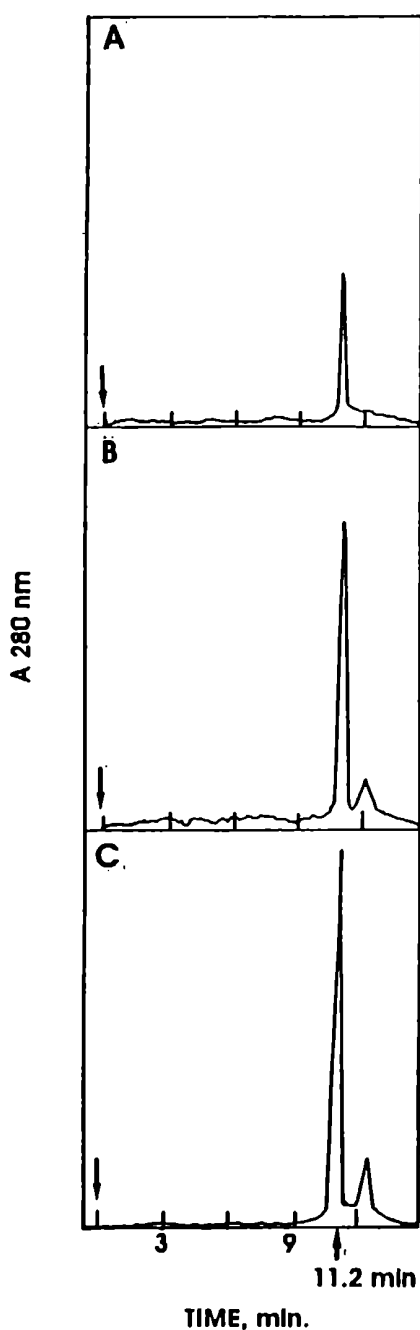


FIG 20: Identificación de apigenina como el mayor componente de la fracción activa que eluye con el 30% de ACN (fig 18). La coelución fue realizada con una columna C₁₈ analítica con un gradiente lineal de ACN de entre 27-32% en 15 min.

A: 25µl de la fracción 1 (fig 18); B: 25 µl fracción 1 + 4 µg de apigenina sintética; C: 10 µg de apigenina sintética. El tiempo de retención del pico principal fue de 11.2 min en todos los casos. El pico menor que aparece en B y C es una impureza del estándar de apigenina.

Arriba a la derecha: estructura química de la apigenina (5,7,4' trihidroxiflavona).

Ensayos de unión con radioligandos

Apigenina inhibió la unión de ^3H FNZ a membranas sinaptosomales de corteza de vaca con una $K_i = 4\mu\text{M}$ y con un número de Hill de 0.95 ± 0.07 ($n=3$) (fig 21). El análisis por Scatchard de las curvas de saturación en ausencia o presencia de apigenina, revelan una interacción competitiva con el RCBZD.

Sin embargo apigenina $10\mu\text{M}$ no afectó la unión de ^3H quinuclidinil benzilato, ^3H prazosin o ^3H muscimol, respectivamente a los receptores muscarínicos, α adrenérgicos o GABA_A .

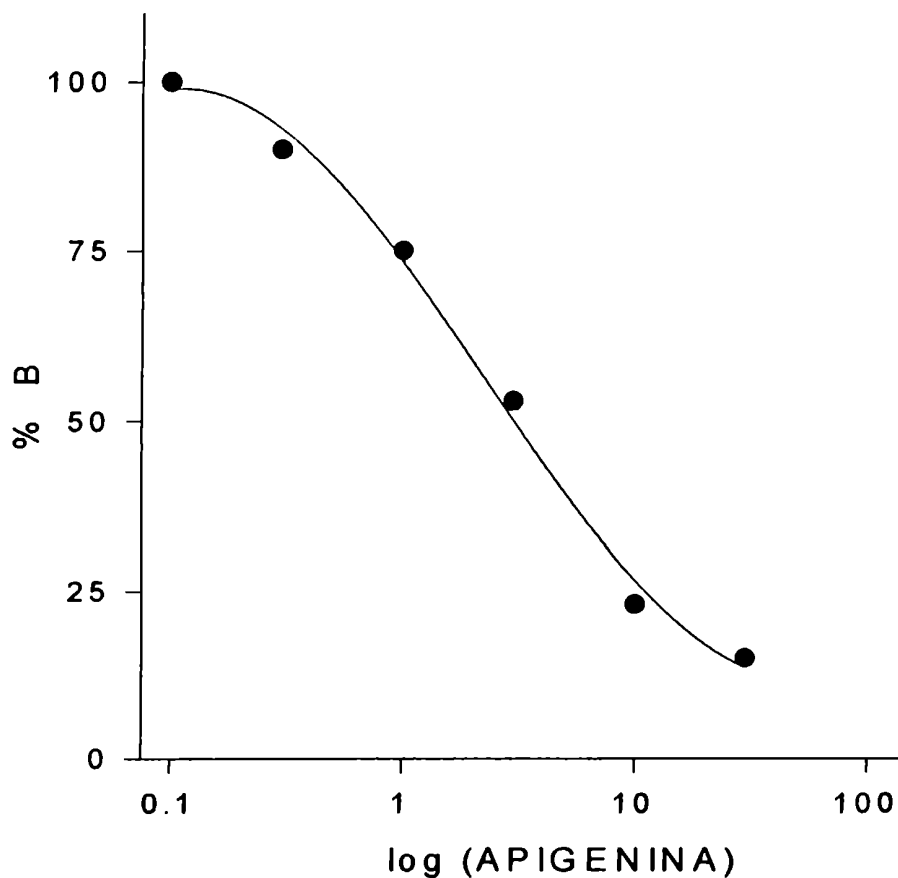


FIG 21: Curva de desplazamiento de 0.7 nM de ^3H FNZ a membranas sinaptosomales de corteza de vaca, por concentraciones crecientes de apigenina (100nM - $30\mu\text{M}$).

% B: % de ^3H FNZ unido al receptor.

Medición del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de corteza de rata:

La adición de $12\ \mu\text{M}$ de GABA al sistema, provocó un aumento del 35% en el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ a los sinaptoneurosomas. Se observó que $5\ \mu\text{M}$ de apigenina no provocó cambios significativos en el flujo del ión estimulado por GABA. La disminución en el flujo ocasionado por $20\ \mu\text{M}$ de apigenina no fue bloqueada por la presencia del antagonista específico del RCBZD, Ro 15-1788 (fig 22).

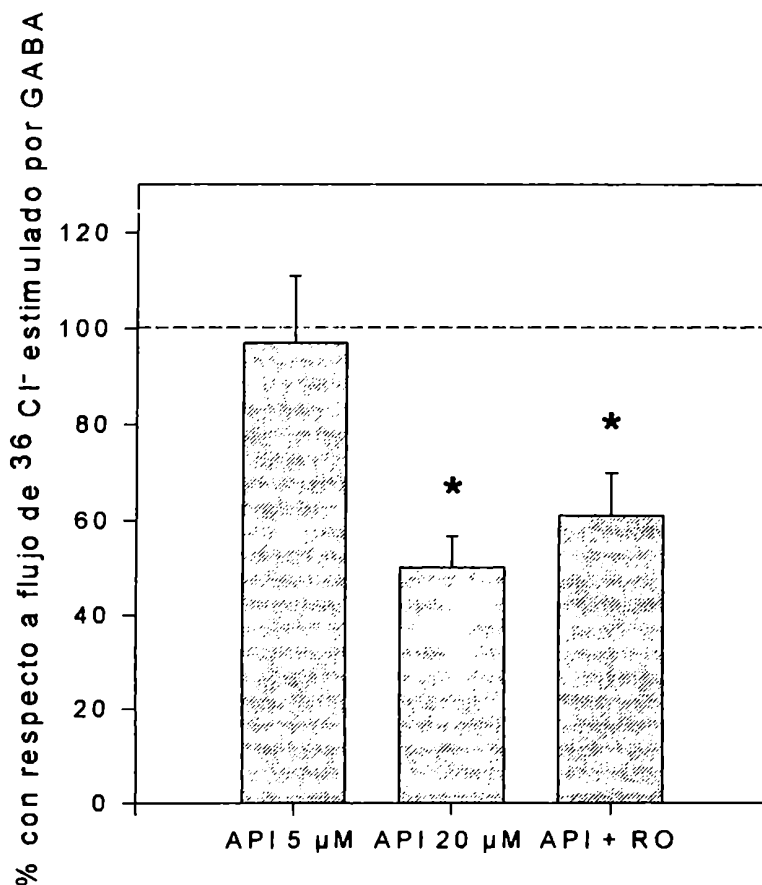


FIG 22: Efecto de apigenina en el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de corteza de rata. Las barras representan los porcentajes de modulación del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ estimulado por GABA $12\ \mu\text{M}$ (37% superior al control) en corteza cerebral de rata. Los sinaptoneurosomas (1.2 mg proteína / tubo) fueron preincubados a 30°C durante 10 min con apigenina y/o Ro 15-1788 ($10\ \mu\text{M}$) por 3 segundos en presencia de $0.23\ \mu\text{Ci}$ de $^{36}\text{Cl}^-$ / tubo.

Los porcentajes se calcularon a partir de las medias \pm ES de 9-14 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ respecto al flujo estimulado por GABA, test de Newman Keuls, luego de ANOVA.

Efectos farmacológicos de la apigenina

Test de actividad locomotora:

Apigenina no produjo cambios en la actividad locomotora espontánea en ratones inyectados ip con dosis de hasta 10 mg/kg (fig 23). Administrada en 30 y 100 mg/kg se observó una reducción en dicho parámetro de un 26 y un 48% respectivamente (fig 23).

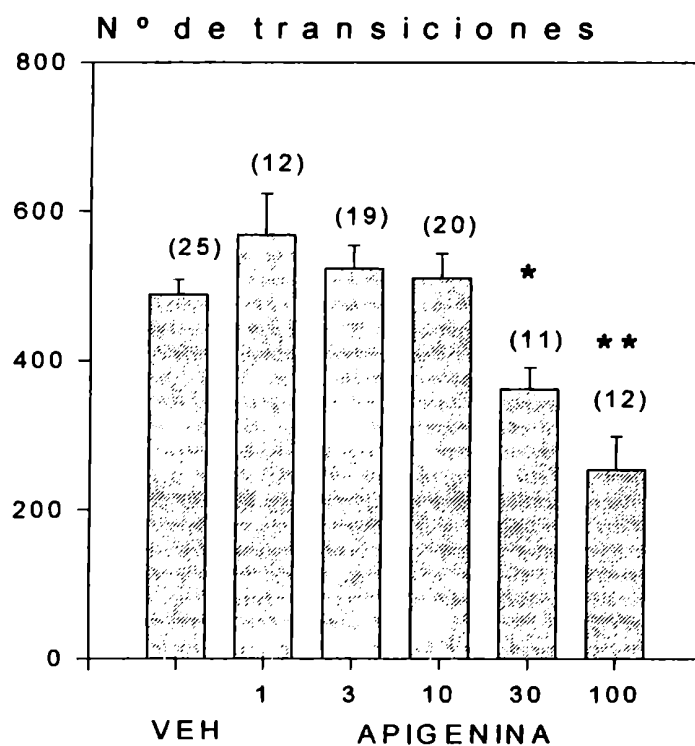


FIG 23: Actividad locomotora ambulatoria en los ratones (registrada automáticamente en el aparato OPTO-Varimex) 15 min después de una inyección ip de vehículo (VEH) o apigenina (1-100 mg/kg). Los datos se expresan como medias \pm ES, calculadas con los registros de los (n) animales ensayados.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, test de Newman Keuls, luego de ANOVA.

Test del laberinto en cruz elevado:

Se encontró que la dosis de 3 mg/kg de apigenina es ansiolítica cuando se administra ip en ratones. Ello se evidencia en el aumento de la exploración a las ramas abiertas ($p < 0.01$) tanto como en el incremento del tiempo de permanencia en ellas ($p < 0.01$) (fig 24). No se observaron diferencias en el número total de ramas visitadas por los animales de los diferentes grupos experimentales (fig 24).

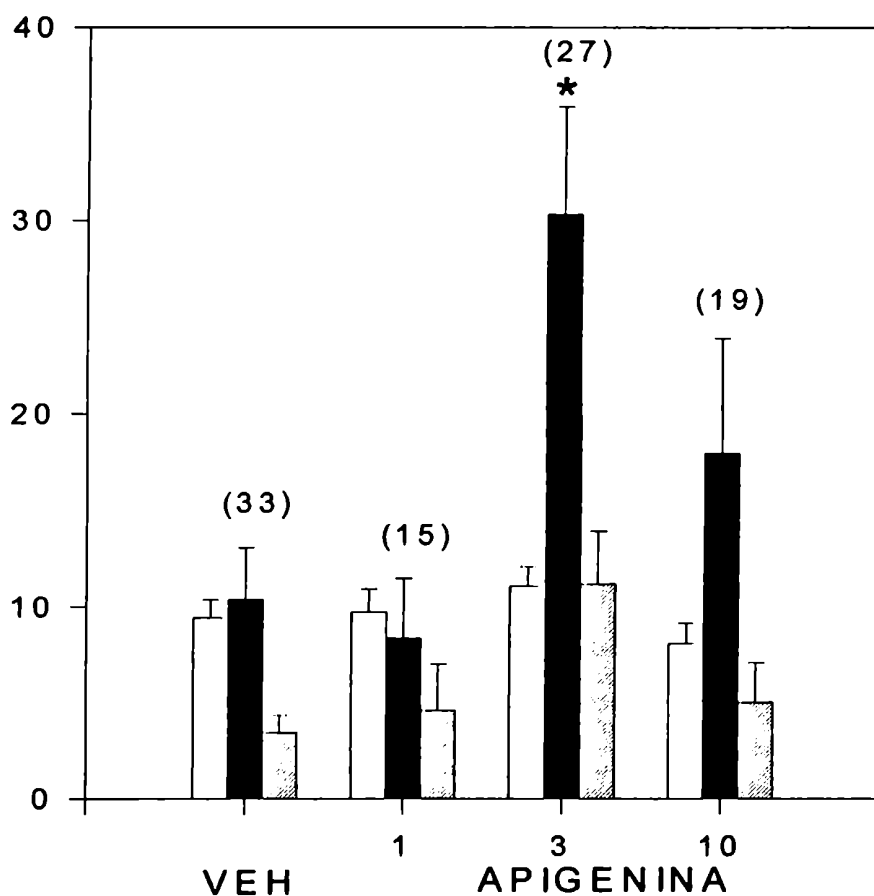


Fig 24: Comportamiento de los ratones en el test del laberinto en cruz elevado, 20 min después de la inyección ip de vehículo (VEH) o apigenina (1-10 mg/kg). Los resultados se expresan como medias \pm ES del número de entradas totales (barras blancas), % de entradas a las ramas abiertas (barras negras) o % de tiempo pasado en las mismas (barras rayadas), registrados durante 5 min
* $p < 0.01$, test de Dunnett, luego de ANOVA. El número de ratones utilizados se indica ().

En otra serie de experimentos se observa que el efecto ansiolítico ocasionado por la apigenina (3 mg/kg) es abolido con la administración previa del antagonista específico del RCBZD, Ro 15-1788 ($p < 0.05$) (fig 25).

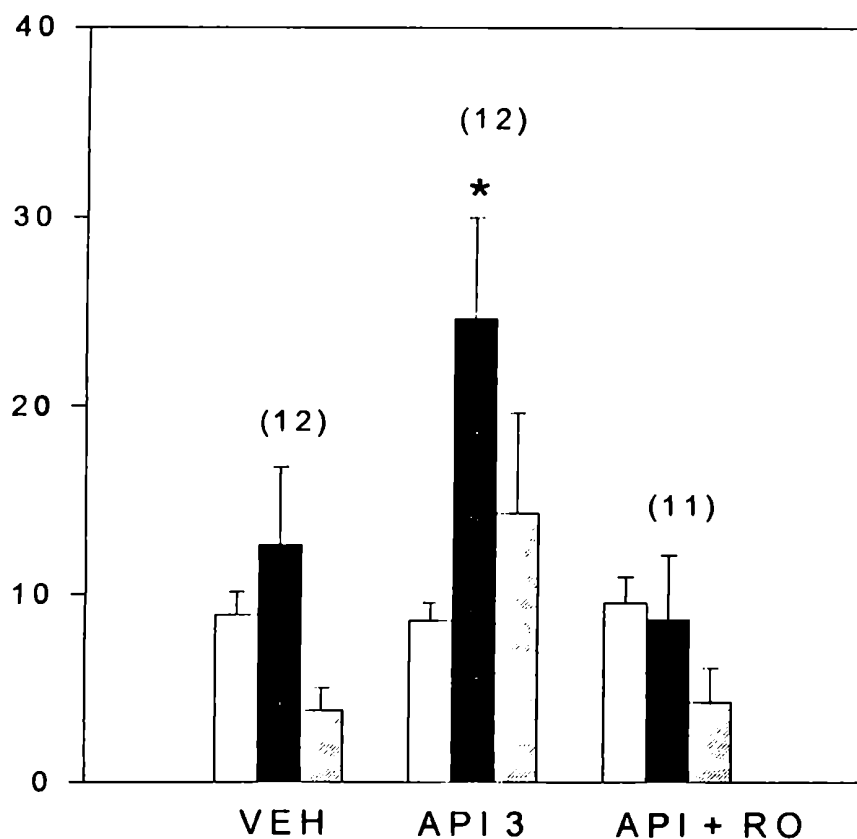


FIG 25: Media \pm ES del número de entradas a las ramas totales (barras blancas), del % de entradas a las ramas abiertas (barras negras) o del % de tiempo de permanencia en ellas (barras rayadas), registrado durante 5 min en el test del laberinto en cruz elevado, luego de 20 min de la inyección ip a ratones de vehículo (VEH), apigenina (3 mg/kg) o apigenina (3 mg/kg) + Ro 15-1788 (3 mg/kg, administrado ip 10 min antes de la droga).

* $p < 0.05$ significativamente diferente al control, test de Dunnett, luego de ANOVA.

Test de "holeboard":

En este test, bajas dosis de apigenina (3 y 10 mg/kg, ip) no modificaron los parámetros medidos exceptuando un leve aumento de los "rearings" a la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.05$). Sólo a dosis altas (30 y 100 mg/kg, ip) apigenina produjo un moderado descenso en el tiempo y número de exploración a los agujeros (30 mg/kg) o en el número de "rearings" (100 mg/kg) (fig 26). Estos resultados sugieren un leve efecto sedativo a altas dosis de apigenina.

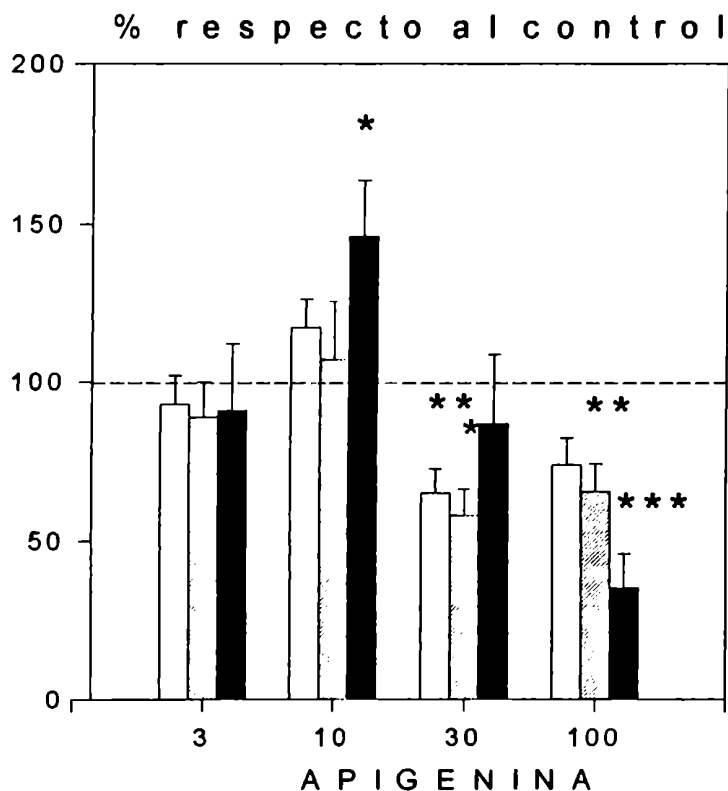


Fig 26: Comportamiento de los ratones en el test de "hole board", 20 min luego de la inyección ip de vehículo (VEH) o apigenina (3-100 mg/kg). Los resultados se expresan como el porcentaje \pm ES (respecto a los controles) del número de exploraciones a los agujeros (barras blancas), del tiempo que permanecen con la cabeza en ellos (barras rayadas) y del número de "rearings" (barras negras). El número de ratones/grupo fue entre 12 a 19. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.005$, test de Student.

Test del alambre:

En contraste al franco efecto miorrelajante ocasionado por diazepam a partir de la dosis de 3 mg/kg, la apigenina administrada ip hasta 100 mg/kg no disminuyó la tonicidad muscular (fig 27).

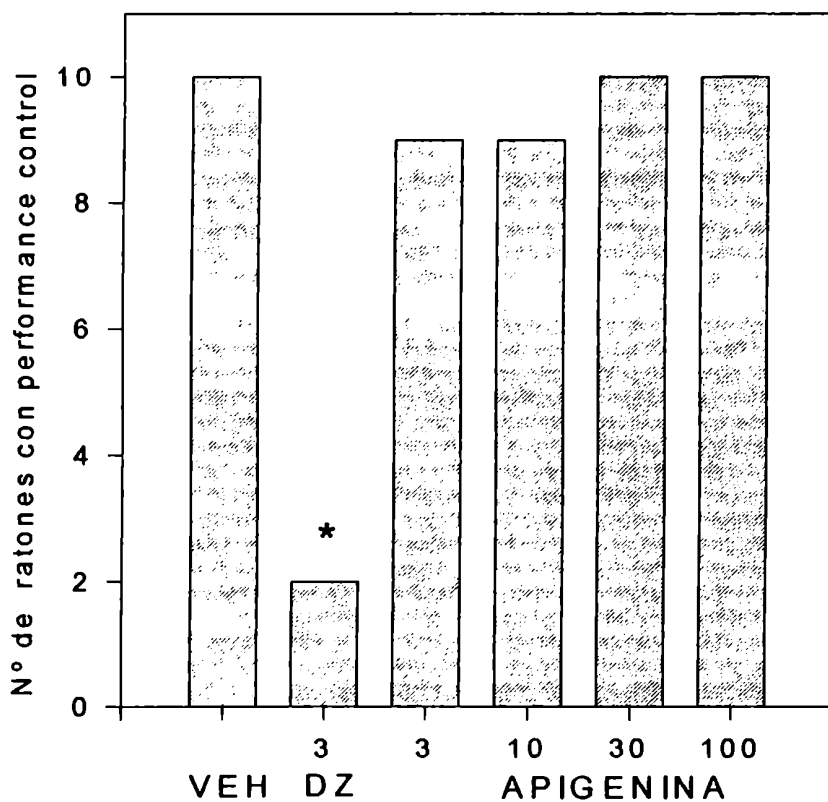


FIG 27: Comportamiento de los ratones en el test del alambre horizontal, 15 min después de recibir una inyección ip de vehículo (VEH), diazepam (3 mg/kg DZ) o apigenina (3-100 mg/kg).

El número de ratones por grupo fue de 10. El test se realizó luego de dos entrenamientos ajecutados con 5 min de intervalo.

* $p < 0.01$, test de Kruskal Wallis.

Convulsiones provocadas por pentilenetetrozol:

El pentilenetetrozol provoca convulsiones de creciente graduación según la dosis a la cual es administrada. Se ajustó en cada experimento realizado, una dosis tal que provocara convulsiones clónicas a los ratones. Se registró si, ya sea, el diazepam o la apigenina inyectados ip 15 minutos antes del convulsivante, podían impedir el desarrollo de los clonus. Se comprobó que el diazepam en dosis de 3 mg/kg es un efectivo anticonvulsivante, sin embargo hasta la dosis de 80 mg/kg apigenina no evidenció un efecto semejante, sólo las dosis mayores a 20 mg/kg lograron retrasar el inicio de las convulsiones, pero en ningún caso las previnieron (tabla 5).

TABLA 5: EFECTO DE LA ADMINISTRACION IP DE DIAZEPAM O APIGENINA SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR PENTILENETETRAZOL.

Dosis	(mg/kg)	Nº de ratones ensayados	% de ratones con clonus	Latencia (segundos)
PTZ		26	100	83 (65/107)
Diazepam	3 + PTZ	6	0	
Apigenina	3 + PTZ	8	100	87 (73/100)
Apigenina	20 + PTZ	10	100	187 (68/240) *
Apigenina	40 + PTZ	14	86	140 (90/218) **
Apigenina	80 + PTZ	11	100	150 (140/330) ***

La dosis convulsivante de pentilenetetrozol, varía entre 50 y 80 mg/kg acorde al experimento.

Los datos se expresan como las medianas (rangos intercuartiles).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test de Mann Whitney).

Tratamientos crónicos con apigenina

Como se comentó recientemente, la administración aguda de apigenina permitió la libre exploración de los ratones a sitios reconocidos como aversivos, evidenciando tener acciones ansiolíticas. El tratamiento de la ansiedad, en muchos casos requiere el consumo prolongado de fármacos, que puede acarrear la consecuencia del desarrollo de mecanismos de tolerancia que impiden que aquella dosis del compuesto mantenga su eficacia.

Para evaluar si con la administración prolongada la apigenina conservaba su efecto ansiolítico, se llevó a cabo una serie de tratamientos crónicos. La inyección diaria ip de 3 mg/kg de apigenina continuada por 7 días en ratones, no modificó la actividad locomotora ni provocó cambios significativos en los parámetros registrados en el test del laberinto en cruz elevado (fig 28)

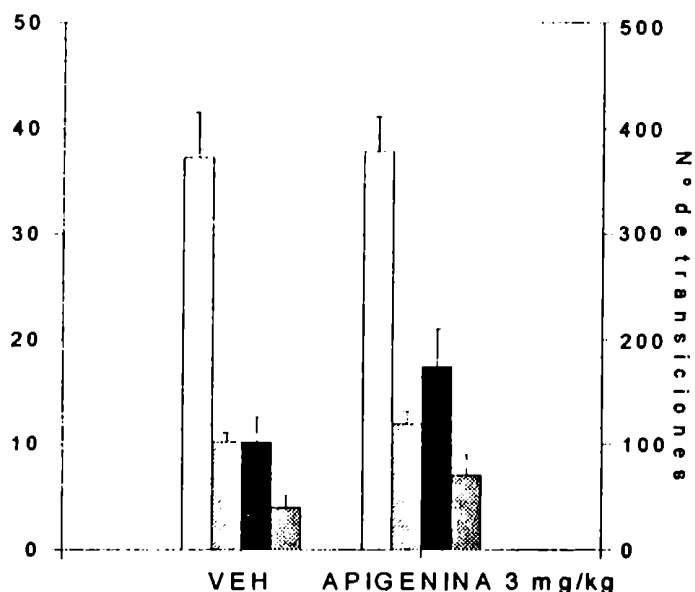


FIG 28: Administración crónica de apigenina. Se inyectan ip ratones con vehículo (VEH) o 3 mg/kg de apigenina durante 7 días. Al séptimo día luego de 15 min de la inyección se testean los animales en el OPTO Varimex seguido del test del laberinto en cruz elevado. Las barras indican las medias \pm ES de : la actividad locomotora registrada durante 5 min (barras blancas), el N° de entradas totales (barras rayadas), el % de entradas a las ramas abiertas del laberinto (barras negras) o el % de tiempo que permanecieron en ellas (barras a cuadros). $p > 0.05$, ANOVA.

En otra serie de experimentos se decidió utilizar el sistema de microinyección ofrecido por bombas osmóticas que liberan la droga en forma subcutánea y continua. En esta ocasión se sometió a los ratones a 14 días de administración de apigenina en dosis de 10 mg/kg. Los seis animales experimentales testeados se desarrollaron satisfactoriamente en la tarea de exploración en el laberinto, aunque los resultados obtenidos no difirieron de la valores controles (% entradas a ramas abiertas: 12.63 ± 3.09 y % tiempo en ellas: 11.65 ± 4.3).

DISCUSION

En el presente estudio se ha demostrado que la *Matricaria recutita* contiene varios ligandos al RCBZD, uno de ellos identificado como 5,7,4' trihidroxiflavona (apigenina). Se han encontrado grandes proporciones de apigenina libre en manzanillas autóctonas, así como en especies de otros países del mundo (Amat, 1982; Carle y col, 1993).

Apigenina se une al RCBZD con una K_i en el rango bajo micromolar, exhibiendo una inhibición de tipo competitivo a la unión de 3H FNZ a membranas sinaptosomales de corteza bovina. Por otra parte esta unión parece ser bastante selectiva, puesto que no mostró afinidad hacia otros tipos de receptores, tales como los α adrenérgicos, muscarínicos o gabaérgicos.

La presencia de 5 μM de apigenina en sinaptosomas de corteza de rata, no alteró el flujo de Cl^- estimulado por GABA. Altas dosis ensayadas de apigenina (20 μM), disminuyeron el efecto de GABA, sin embargo éste fenómeno parece no ser mediado por el RCBZD ya que no se revirtió por el agregado del antagonista específico del receptor, R0 15-1788. En ningún caso la apigenina en ausencia de GABA provocó alteraciones en el flujo del ión (experimentos preliminares), lo cual sugiere que los cambios requieren la presencia del neurotransmisor.

La apigenina posee una actividad ansiolítica, sin evidenciar sedación, en dosis similares a las empleadas con las clásicas BZD. El incremento en el porcentaje de ramas abiertas exploradas, así como la mayor permanencia en ellas es un claro indicador de la actividad ansiolítica de la apigenina administrada agudamente (Pellow y col, 1985; Pellow y File, 1986a). Esta acción puede impedirse si se administra R0 15-1788, el bloqueante específico del RCBZD, lo cual sugiere que la activación de dicho receptor es la responsable del efecto ansiolítico de la apigenina.

La ineficacia de las bajas dosis de la droga para disminuir la actividad locomotora espontánea, así como la exploración general a los agujeros en el test del holeboard, o las exploraciones a las ramas cerradas del laberinto en cruz elevado, sugiere que la apigenina no tiene efectos sedativos o depresores de la actividad locomotora a aquellas dosis a las que induce su acción ansiolítica (File, 1985; Pellow y File, 1986b; Cruz y col, 1994). Sin embargo, un incremento de 10 veces la dosis (30 mg/kg) produce una leve disminución del 26% en la actividad locomotora y una pequeña reducción en el número de agujeros visitados. Estos resultados probablemente reflejen una leve acción sedativa sólo a dosis altas. Cabe recordar, que las clásicas BZD producen un reducción mayor al 80% en estos parámetros, cuando son inyectadas en dosis 5 a 10 veces superiores (3 a 6 mg/kg) a aquellas que provocan ansiolisis (0.3 a 1 mg/kg) (Novas y col, 1988; Rolland y col, 1991 y ver capítulo 1 de esta tesis).

En los experimentos de convulsiones inducidas por pentilenetetrazol, ninguna dosis de apigenina (ip) pudo imitar el efecto anticonvulsivante del diazepam; sólo en dosis superiores a 20 mg/kg, la apigenina logró retrasar el inicio de los clonus, pero dicho efecto es leve y no reviste relevancia farmacológica.

Los experimentos crónicos con apigenina, fueron realizados para evaluar si la administración prolongada de la droga genera el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico, es decir la pérdida del efecto evidenciado con la administración aguda. Los tratamientos de los desórdenes de la ansiedad, requieren generalmente la cronicidad en la dosificación del fármaco. Los tranquilizantes utilizados en la actualidad, BZD, presentan la dificultad de disminuir los efectos provocados por una misma dosis en las sucesivas administraciones.(File, 1981; Haefely, 1983; File, 1985b; Treit, 1985).

Se pensó que esta nueva serie de compuestos ansiolíticos naturales (los flavonoides), podrían ofrecer la ventaja de especificidad de acción y disminución del riesgo al desarrollo de fenómenos tolerantes, pero los experimentos presentados en esta tesis resultan preliminares y no concluyentes. En principio, es necesario advertir que la metodología de inyecciones continuadas en animales adiciona un factor estresante que debe ser objetivamente identificado el día del testeo. Los resultados presentados fueron promediados a partir de tres series experimentales realizadas en las "mismas condiciones" en diferentes épocas del año. En todos los casos, los animales se desempeñaron satisfactoriamente y se mantuvo coherencia en las mediciones intraexperimentales. Debo destacar, sin embargo, que se observaron dos poblaciones diferentes de mediciones, donde nueve de los ratones testeados en la última fecha se comportaron decididamente como los experimentos con apigenina aguda. Consecuentemente el tratamiento con 3 mg/kg ip de apigenina por 7 días arroja datos preliminares y heterogéneos.

En conclusión, el conjunto de los resultados sugieren que la apigenina inyectada agudamente (ip en ratones) posee efectos ansiolíticos mediados por el RCBZD, sin producir una marcada acción depresiva sobre el SNC.

La literatura registra muchas otras actividades biológicas de la *Matricaria recutita* (Hausen, 1992), pero las investigaciones acreditan su acción espasmolítica, antiinflamatoria. Della Loggia y col (1982) trabajaron con el extracto acuoso crudo de *Matricaria recutita*, al cual atribuyeron una acción depresiva sobre el SNC evidenciada por disminución de la actividad locomotora espontánea, de la exploración en el holeboard y del aumento del tiempo de sueño. Estos resultados fueron reproducidos con el extracto original utilizado en este trabajo, a pesar de ello es improbable que sea debido a la presencia de la apigenina ya que por su leve poder

sedativo sería necesario que el contenido de la droga en la planta representara el 50% de su peso seco. Debe considerarse que la acción farmacológica observada puede ser debida a la combinación de varios constituyentes del extracto (De Feudis, 1991).

Como se ha mencionado, los extractos obtenidos a partir de las manzanillas poseen varios constituyentes, entre ellos las cumarinas (espasmolíticas), las azulenos (antiflogísticos) el alfa bisabolol (alcohol sesquiterpénico con acción antiulcerosa) y los flavonoides. Se destaca la acción espasmolítica de la apigenina sobre la musculatura lisa, donde es tres veces más potente que la papaverina (Amat, 1982) y la actividad antiinflamatoria (Della Loggia y col, 1986) pero hasta el momento no se les había atribuido a los flavonoides un efecto sobre el sistema nervioso central. Otras acciones de la apigenina, incluyen la inhibición de enzimas tales como la que depolimeriza el ácido hialurónico (Middleton y Kandaswami, 1993) y la protein quinasa C con la consecuente reducción en la liberación de histamina, lo que disminuye la promoción de tumores y los procesos inflamatorios (Perce y col, 1984; Anton, 1988; Middleton y Ferriola, 1988). También se la reconoce como agente antiviral y antiagregante plaquetario (Landolfi y col, 1984; Selway, 1986).

Las manzanillas argentinas proporcionan el mayor contenido de cumarinas y apigenina libre, lo que hace resaltar la importancia del estudio de estas especies, que además representan una gran fuente de exportación a los países europeos (Collura y Storti, 1971; Hausen, 1992).

CAPITULO III

**AISLAMIENTO DE LIGANDOS AL RCBZD
 CON ACTIVIDAD FARMACOLOGICA, A PARTIR DE LA
 *TILIA TOMENTOSA***

RESULTADOS

Las especies de *Tilia* son tradicionalmente usadas en latinoamérica como sedativas y tranquilizantes. Por este motivo sus flores son valiosas para preparar infusiones. Este estudio se basó en el análisis químico, bioquímico y farmacológico de extractos de *Tilia tomentosa*, una de las especies disponibles en nuestro medio.

Aislamiento e identificación del kaempferol:

Se pulverizó 1 kg de flores de *Tilia tomentosa* y se realizó la extracción con 70% de etanol por 48 horas en un aparato Soxhlet. Luego de evaporar la parte alcohólica, el residuo acuoso fue extraído con n-butanol. El extracto butanólico fue evaporado a sequedad y el residuo sometido a cromatografía de distribución en contracorriente, en el sistema benzeno, cloroformo, metanol, agua (2:1:2.3:0.7) en un aparato automático.

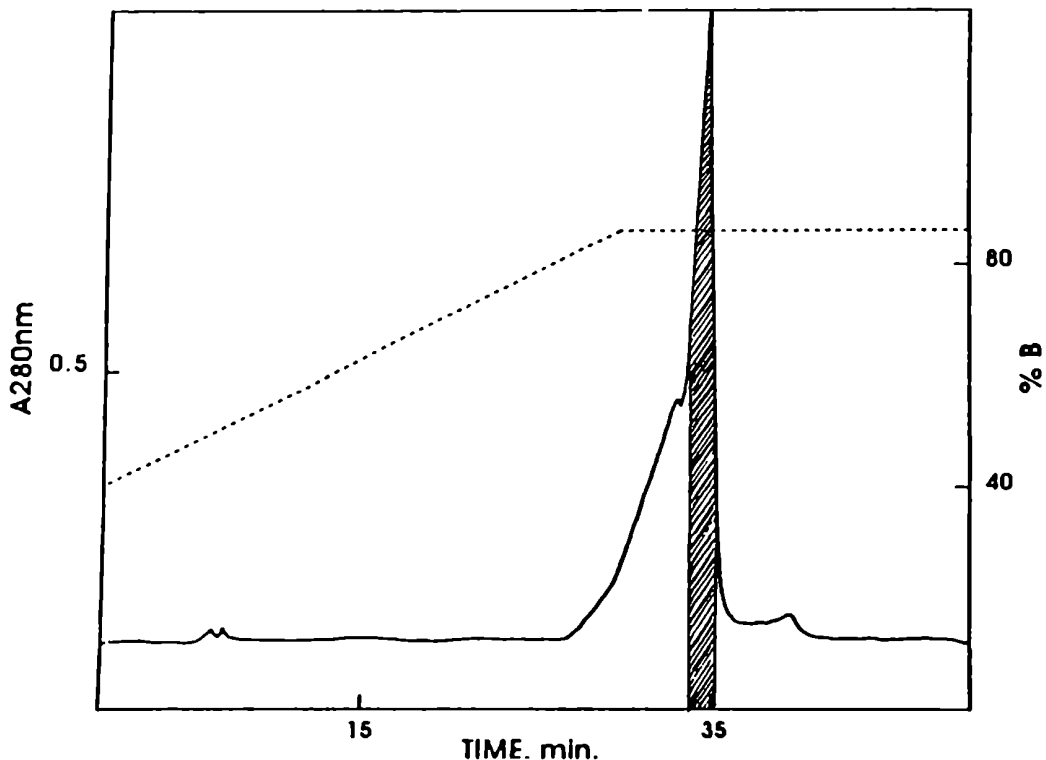


FIG 29: HPLC en una columna analítica de fase reversa C_4 , de una fracción del extracto de flores de *Tilia tomentosa*, activo en ensayos de unión al RCBZD, obtenido luego de varios pasos de purificación (ver texto). Solvente A: 10% metanol en agua, B: 50% metanol, 1% propanol en agua. La elución fue llevada a cabo con un gradiente lineal con 40-80% del solvente B en 30 min, seguido por la elución isotónica. La zona sombreada indica la fracción activa en ensayos de unión al RCBZD.

Se guió la búsqueda analizando la presencia de ligandos al RCBZD a lo largo del tren de distribución y se agruparon las fracciones activas que fueron cromatografiadas en columnas de sílica gel, eluidas con cloroformo, acetona(1:0.1). Los constituyentes activos se sometieron a fraccionamiento por fase reversa en columnas C18 y C4 (semipreparativas y analíticas) de HPLC, utilizando gradientes de acetonitrilo en agua o metanol propanol en agua. El último paso *de este* fraccionamiento se muestra en la figura 29.

Dicha fracción activa fue identificada por espectrometría de masa como kaempferol (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) (fig 30). Se comprobó, también, que el kaempferol standard presentaba el mismo tiempo de retención bajo las mismas condiciones utilizadas en nuestro sistema de HPLC (datos no mostrados).

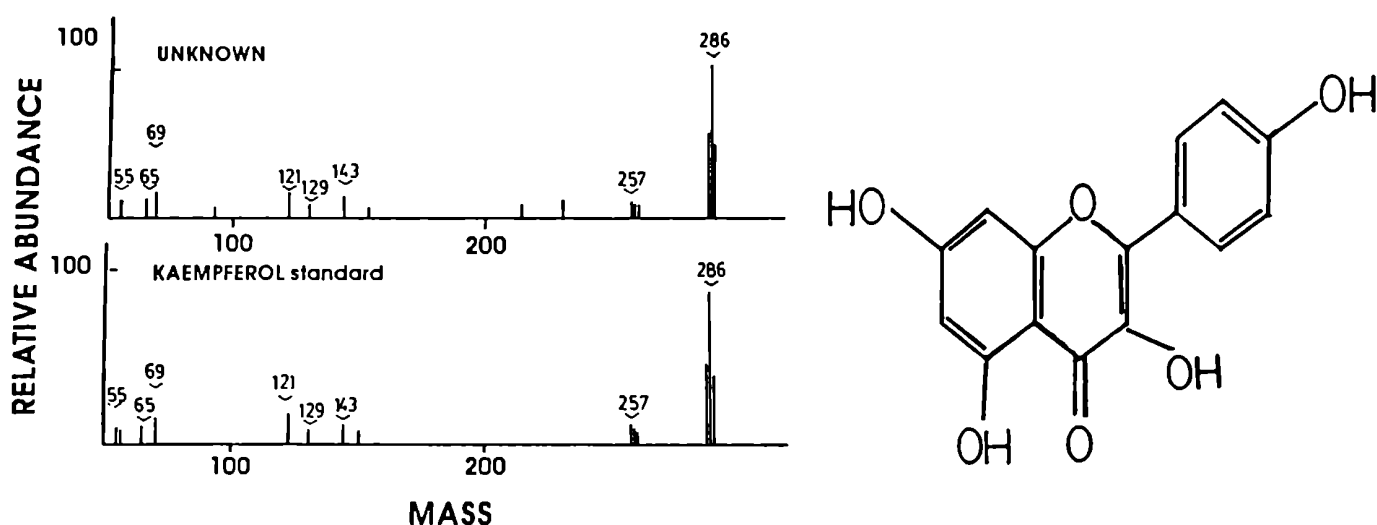


FIG 30: Identificación por espectrometría de masa del kaempferol. A: pico activo de la fig 29; B: kaempferol estándar. Estructura química del kaempferol.

Experimentos de unión al RCBZD:

Kaempferol inhibió la unión de ^3H FNZ a membranas de corteza de vaca lavadas exhaustivamente con una $K_i=93 \mu\text{M}$ ($n=3$). El análisis por Scatchard de las curvas de saturación reveló una interacción competitiva.

Farmacología del kaempferol

Laberinto en cruz elevado:

La inyección ip en ratón de kaempferol (1-10 mg/kg) no provocó cambios significativos en la exploración evaluada en este test (fig 31). Contemplando la baja afinidad del compuesto un aumento en 10 veces la dosis inyectada (100 mg/kg) careció de cualquier efecto plausible de ser registrado mediante esta metodología (n=11) (datos no graficados).

Como es habitual, se observó en experimentos paralelos, el efecto ansiolítico de la droga de referencia (diazepam 0.6 mg/kg) evidenciado por el aumento del número y tiempo de exploración a las ramas abiertas, en esta serie de animales, en la misma época del año (ver figura 14).

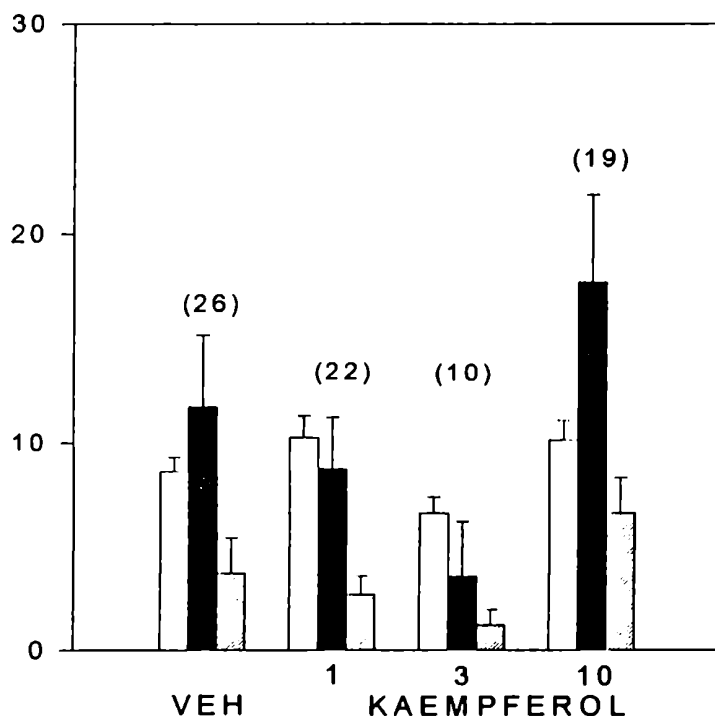


FIG 31:Test del laberinto en cruz elevado. Los resultados se expresan como las medias \pm ES del número de entradas totales (barras blancas), del % de exploración a las ramas abiertas (barras negras) o del % de tiempo (segundos) de permanencia en ellas (barras rayadas).

Reconocimiento de una fracción parcialmente purificada con afinidad al RCBZD y que posee efectos farmacológicos:

Se realizó una modificación al procedimiento de extracción y purificación detallado anteriormente, con la finalidad de obtener mayores cantidades de ligandos al RCBZD. Las flores pulverizadas fueron extraídas con etanol 70% como fue descrito. La solución concentrada fue extraída con éter de petróleo, lo cual se descartó. La fase acuosa de interés, se extrajo repetidas veces con éter etílico. El éter se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 10% acetonitrilo en agua, llevado a pH 7.5 con KOH 1M. Esta solución fue cromatografiada en una columna preparativa C18 de fase reversa (5x3 cm) y eluida con concentraciones crecientes de acetonitrilo. La fracción activa en los ensayos de unión, eluyó con el 80% de ACN. Este material se sometió a fraccionamiento en columnas C18 de fase reversa, en este caso utilizando gradientes de crecientes concentraciones de ACN en medio ácido (0.1 % trifluoroacético) (fig 32). Este material posee las propiedades de solubilidad y absorvancia al UV típicas de los compuestos flavonoides.

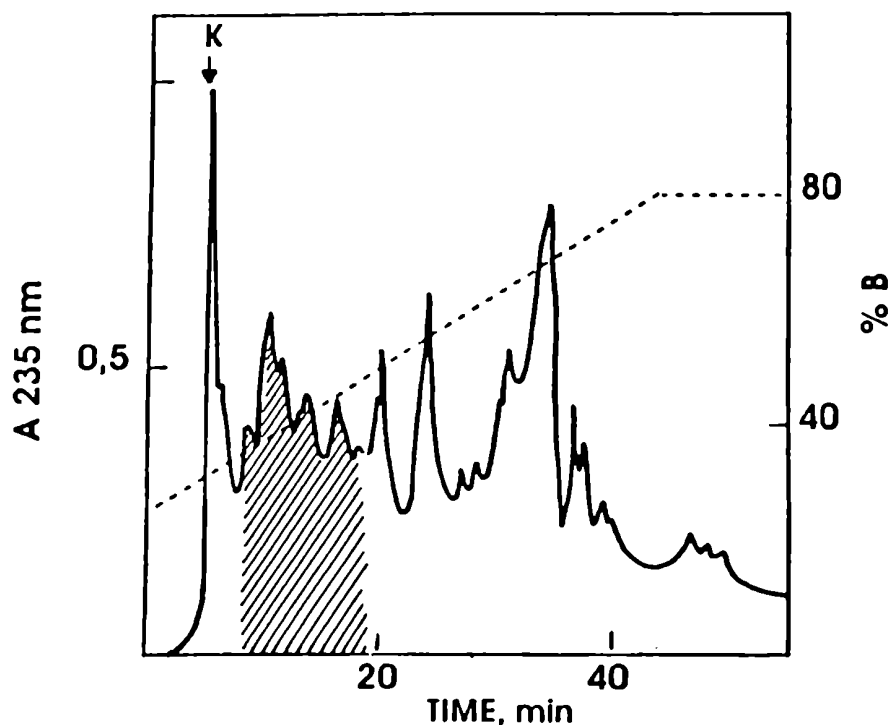


FIG 32: HPLC en columna analítica C₁₈ de fase reversa, de la fracción activa de extractos de *Tilia tomentosa* según lo descrito en el texto. Solvente A: 30% ACN en 0.1% trifluoroacético (TFA); B: 100% ACN. La elución fue realizada con un gradiente lineal entre 30-80% ACN durante 45 min. La región sombreada indica la fracción activa en ensayos de unión al RCBZD y eluye entre 40-50% ACN (no contiene al kaempferol=K).

Experimentos de unión al RCBZD:

La zona sombreada mostrada en la fig 32, incluye las fracciones que eluyen en un gradiente de entre 40-50% ACN que excluye la presencia de kaempferol (que eluye entre 32-35%ACN). Dicha fracción presenta actividad inhibitoria sobre la unión de ^3H FNZ a membranas de corteza cerebral de vaca. La actividad fue cuantificada con unidades arbitrarias de inhibición (UI) definidas como la cantidad de los constituyentes de la planta requeridos para inhibir el 50% de la unión de ^3H FNZ al RCBZD. En dos experimentos independientes se obtuvieron, en la fracción activa señalada en la figura 32, valores de 5 UI por gramo del material de partida.

Farmacología de la fracción parcialmente purificada del extracto de *Tilia tomentosa*:

La actividad locomotora espontánea es un parámetro global que detecta el estado general presentado por los animales. La fracción parcialmente purificada de la fig 32, inyectada ip en una cantidad equivalente a 1 gramo de planta original por animal, no produjo alteración en la actividad locomotora de los ratones (tabla 6).

TABLA Nº 6: EFECTOS DE LA FRACCION PARCIALMENTE PURIFICADA DE *TILIA TOMENTOSA* SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA TOTAL Y AMBULATORIA REGISTRADA EN RATONES.

	n	Total	Ambulatoria
Vehículo	13	650 ± 48	482 ± 41
<i>Tilia tomentosa</i>	20	662 ± 30	510 ± 24

Los valores se expresan como la media ± ES del número de transiciones al haz de luz durante 5 min de testeo en el OPTO Varimex.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos, $p > 0.05$, test de Student' ($T(31, 0.05) = 0.21$ y 0.59 respectivamente).

Cada ratón recibió una inyección ip de la fracción, equivalente a 1g de planta original y luego de 15 min se realizó la medición.

Test del laberinto en cruz elevado:

La administración ip en ratones de la fracción parcialmente purificada en dosis equivalentes a 1 g de planta original por animal, aumentó la exploración relativa a las ramas abiertas de modo significativo ($p < 0.05$) (fig 33) sugiriendo un efecto ansiolítico.

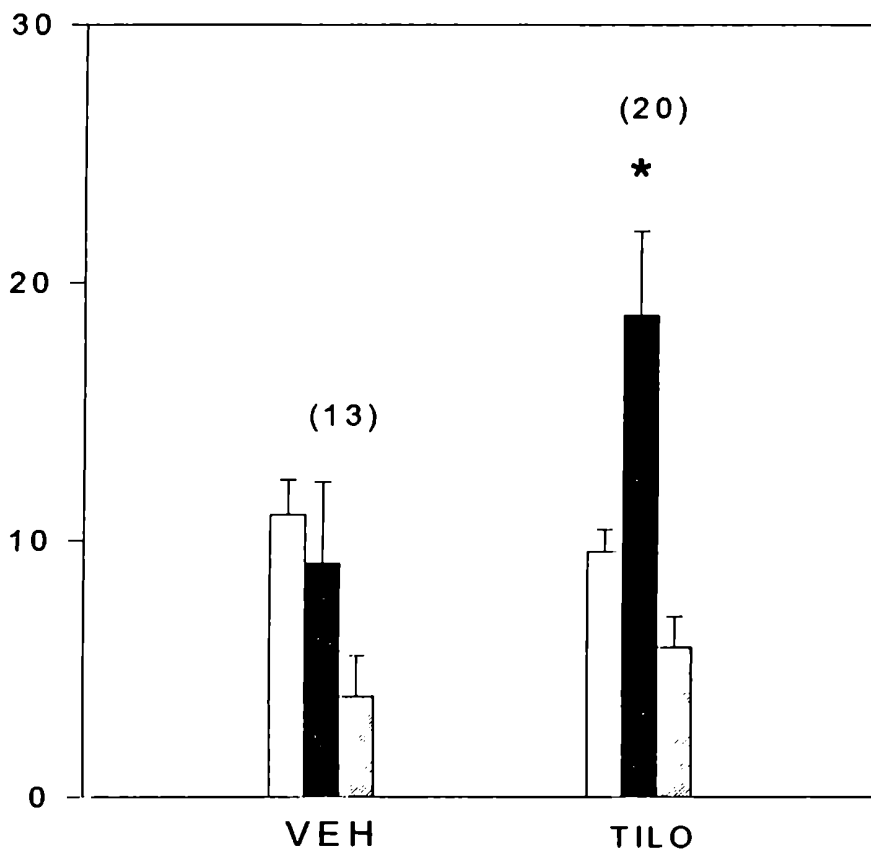


FIG 33: Comportamiento de los ratones en el test del laberinto en cruz elevado, 15 min luego de la inyección ip de vehículo (VEH) o de la fracción de Tilia tomemtoosa parcialmente purificada (tilo) de la fig 32. La dosis utilizada fue equivalente a 1g de planta original / ratón. Los resultados se expresan como las medias \pm ES del número de entradas totales (barras blancas), del % de entradas a las ramas abiertas (barras negras) o del % de tiempo (segundos) de exploración a las ramas abiertas (barras rayadas). El número de ratones/grupo se indica (). * $p < 0.05$, test de Student.

Test de holeboard:

En este test, el mismo material a la misma dosis utilizada, aumentó el número de rearings ($p < 0.05$) sin alterar el número o el tiempo de exploración a los agujeros (fig 34)

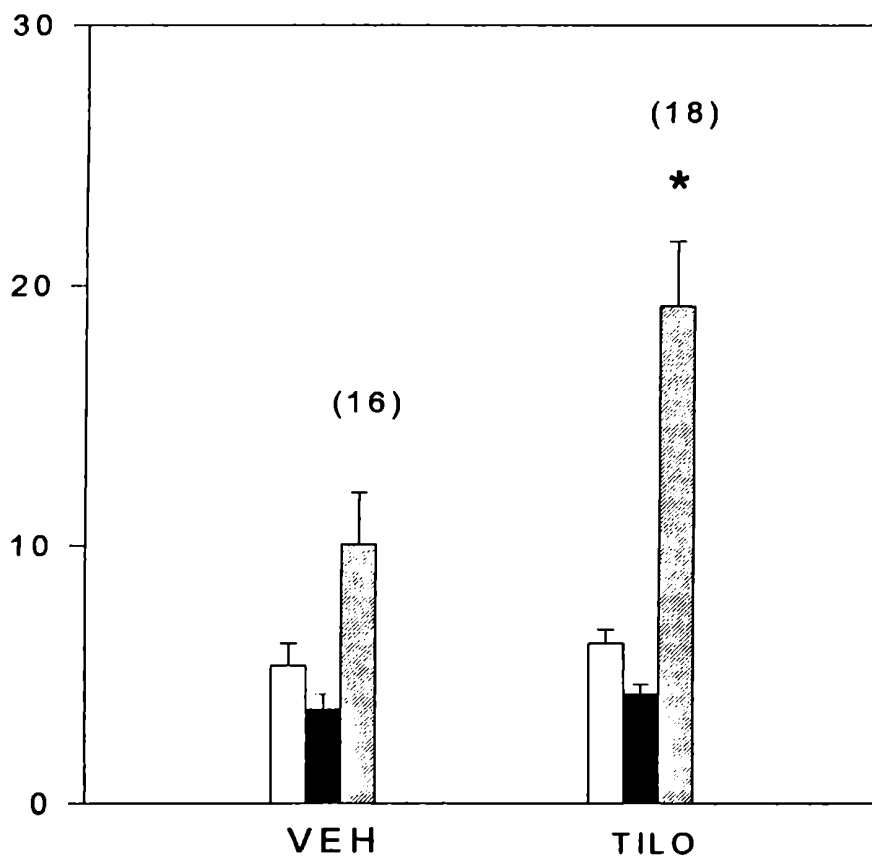


FIG 34: Registros de la actividad exploratoria del ratón durante 5 min en el test del "hole board", luego de 15 min de inyección ip de vehículo (VEH) o de la fracción de *Tilia tomentosa* parcialmente purificada (de la fig 32). La dosis administrada fue equivalente a 1 g de la planta original / ratón. Los resultados se expresan como la media \pm ES del número de exploraciones a los agujeros (barras blancas), del tiempo (segundos) con la cabeza en ellos (barra negras) o del número de "rearings" (barras rayadas). El número de ratones se indica (). * $p < 0.05$, test de Student.

DISCUSION

Las especies de *Tilia* son usadas desde hace mucho tiempo para preparación de tés sedativos o tranquilizantes, para disminuir los disturbios debidos a la excitación nerviosa. El espectro de acciones que se le atribuyen incluye propiedades diaforética, espasmolítica, vasodilatadora e hipotensiva. La lista de efectos es aún mayor, reportándose su uso en desórdenes cardíacos, diaquinesias, dispepsias, epilepsia, gastritis, dolor de cabeza, náuseas, neuralgias, palpitaciones, reumatismo, ciática, espasmos, enuresis, hemorragias, oftalmia, urticaria (Duke, 1985) y ,como si fuera poco, se utiliza la linfa para prevenir la caída del pelo!

Muchas de éstas acciones se logran con preparados acuosos de la planta que están exentos de toxicidad en administraciones agudas o crónicas, ya sean subcutáneas, orales o intraperitoneales.

Tal conocimiento etnofarmacológico no se correlaciona con la identificación de los principios responsables de la acción terapéutica. Sólo ha podido reconocerse que la acción espasmolítica es debida a la presencia de la vainillina. Sin embargo, muchos son los componentes que se encuentran en las flores de la *Tilia tomentosa*, entre ellos varios flavonoides (quercetina, isoquercetina, 3-glucosido 7-ramnósido-quercetina, kaempferol y derivados y astragalina) así como cumarinas, vitamina C, azúcar, grasas, varios ácidos (ej. farnesol, geraniol, eugenol, cafeico, etc), aminoácidos, etc. (Benigni y col, 1964).

El principal hallazgo de este estudio fue reconocer varios ligandos al RCBZD en la *Tilia tomentosa*, una de las especies vendidas en el mercado. El único ligando que pudo ser inequívocamente identificado fue el kaempferol, que se une de modo competitivo al RCBZD y presenta una $K_i=93 \mu\text{M}$. Inyectado ip en ratones, no evidenció efectos ansiolíticos ni sedativos, en contraposición al efecto ansiolítico provocado por la crisina y la apigenina, ambos flavonoides de mayor afinidad por el receptor (ver capítulos 1 y 2). Probablemente, la baja afinidad por el RCBZD determine la ausencia de efectos farmacológicos, sin embargo el aumento en un orden de magnitud de la dosis de kaempferol tampoco logró ser efectivo. Ello nos indica que el grado de potencia y eficacia farmacológica es distinto según el compuesto flavonoide en cuestión.

El kaempferol es inhibidor de varias enzimas, entre ellas la 5 lipooxigenasa (Welton y col, 1986), la hialuronidasa (Middleton y Kandaswari, 1993) y las quinasas de la cadena liviana de la miosina (Rogers y Williams, 1989). Es, además, un agente antiperoxidante por su capacidad de capturar radicales libres (Pignol y col, 1988; Bors y col, 1990) y participa en procesos antiinflamatorios (Anton, 1988) debido a su poder inhibitorio sobre la liberación de

histamina desde los mastocitos. Interviene en la respuesta inmune bloqueando la división de linfocitos por capturar los radicales libres encargados de estimular la mitogénesis (Pignol y col, 1988) e induce la regresión de papilomas en el ratón (Yasukawa y col, 1988).

Luego de demostrar que el kaempferol no era el responsable del efecto tranquilizante del té de *Tilia tomentosa*, se encaró la búsqueda a partir del extracto etéreo de sus flores. Otros constituyentes, que poseen espectro UV característico de flavonoides, también desplazan la unión de 3H FNZ al RCBZD. Una de las fracciones heterogéneas, que no contiene al kaempferol, produjo efectos ansiolíticos observados en experimentos conductuales con ratones por un aumento selectivo de entradas a las ramas abiertas en el laberinto en cruz elevado y un incremento en los rearings sin reducción de la exploración a los agujeros del holeboard o en la actividad locomotora espontánea, lo cual indica claramente que no produce sedación (File, 1985; Pellow y File, 1986b; Rohmer y col, 1990). Esta fracción parcialmente purificada, no produjo efectos sedativos.

Conociendo la diversidad de compuestos presentes en la *Tilia tomentosa*, se testeó bioquímicamente otros flavonoides (Ver capítulo 5), entre ellos la quercetina e isoquercetina, que están presentes en las flores (Wichtl y col, 1987), pero la afinidad por el RCBZD es más baja que la del kaempferol, lo cual induce a pensar que no revisten importancia farmacológica.

Todos estos resultados sugieren que un componente parcialmente purificado de las flores de la *Tilia tomentosa*, tienen efectos ansiolíticos sin provocar acción depresora sobre el SNC, cuando es administrado ip. Actualmente estamos trabajando, con grandes cantidades del extracto, para definir la naturaleza química de la/s sustancia/s responsables.

Por último, es importante mencionar que algunos de los beneficios terapéuticos de los remedios tradicionales, podrían depender de la combinación sinérgica o aditiva de varios constituyentes presentes en el extracto de la planta (De Feudis, 1991). Entonces ¿cuál/es es/son el/los principio/s activo/s en la *Tilia tomentosa*? La respuesta queda pendiente. Nuestro trabajo está orientado a aislar y purificar compuestos puros a quienes poder asignarles determinados efectos, que puedan reproducir los del extracto o ser parte de ellos. Esta estrategia favorece la estandarización de la dosis y el estudio exhaustivo de los beneficios o desventajas que presente la droga.

CAPITULO IV

LIGANDOS DEL RCBZD

CON ACCION SEDATIVA E HIPNOTICA EN EXTRACTOS DE

SALVIA GUARANITICA

RESULTADOS

Existen antecedentes de la utilización de distintas especies del género *Salvia* para fines curativos. En China, las raíces de *Salvia miltiorrhiza*, conocidas como Tanshen o Danshen, se usan para el tratamiento de enfermedades cardíacas, cerebrovasculares o el insomnio neuroasténico (Chang y But, 1986). Este extracto mejora la circulación sistémica, en particular la coronaria, permite recuperar la contracción cardíaca luego de hipoxia y es un remedio contra la angina de pecho (Nobuyuki y col, 1992). Se suma, además, el efecto anticonvulsivante reportado en las especies de *Salvia sclarea* y *Salvia nemorosa* (Atamassona-Shapova y col, 1969).

Debido a estos antecedentes, resultó interesante incluir a éste género en el presente estudio de acciones sobre el SNC de plantas de uso medicinal folklórico. Se seleccionó la *Salvia guaranítica* debido a que es una especie autóctona, utilizada etnofarmacológicamente.

Fraccionamiento del extracto crudo de *Salvia guaranítica*:

Se partió de 350g de hojas, flores y tallos frescos de *Salvia guaranítica* que fueron deshidratados con 70% de alcohol etílico; se secaron y reextrajeron con el mismo solvente en un aparato Soxhlet. El extracto resultante fue concentrado y fraccionado con éter de petróleo, cuya fase se descartó; el residuo se extrajo con éter dietílico al que se evaporó a sequedad y se sometió a una cromatografía de distribución en contracorriente con un sistema benzeno, cloroformo, metanol, agua ácida 0.1M (2:1:2.3:0.7 v/v). Se agrupó el tren de tubos de la contracorriente en una serie de cuatro fracciones.

Para decidir las fracciones a purificar, en primera instancia, se realizaron experimentos de inhibición de ^3H FNZ al RCBZD en membranas de corteza de vaca. Se tomó el equivalente a 0.6 g del material original por tubo de ensayo, y se observó que las fracciones que presentaban mayor inhibición eran la 1 y la 4 (74 y 82% respectivamente).

Motivados por este resultado bioquímico se continuó con ambas muestras para realizar los experimentos conductuales.

Ensayos farmacológicos de las fracciones crudas obtenidas de la contracorriente:

Medición de la actividad locomotora:

Se registró la actividad locomotora ambulatoria espontánea durante 5 min en forma automática. Los ratones recibieron una inyección ip del material parcialmente purificado por la

contracorriente detallada más arriba. Se les administró el extracto de dichas fracciones en el equivalente a 1 o 3 g de la planta original por ratón. Ninguna dosis utilizada produjo cambios en la actividad locomotora registrada (fig 35)

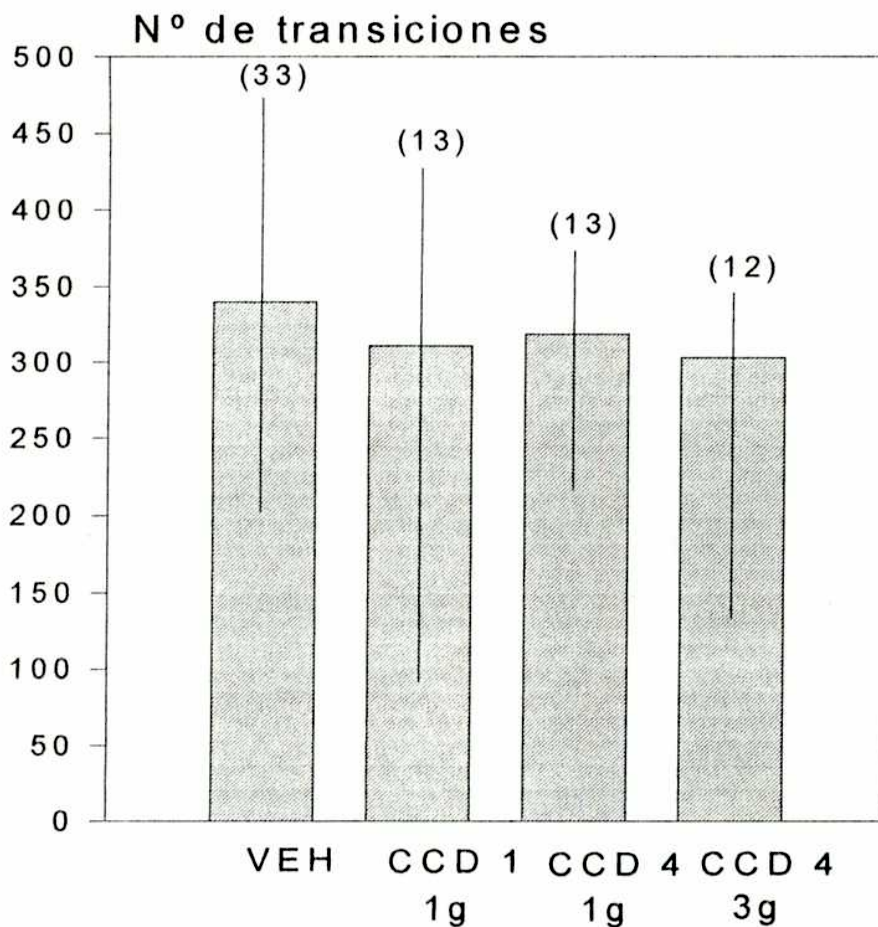


FIG 35: Medianas (rangos intercuartiles) de la actividad locomotora ambulatoria registrada durante 5 min. El test se realizó en ratones luego de la inyección ip de dos fracciones purificadas de *Salvia guaranítica* por distribución en contracorriente (CCD). La dosis administradas fueron equivalentes a 1 o 3 g del material de partida.

No se observaron diferencias significativas, test de Mann Whitney.

Test del laberinto en cruz elevado:

Se testeó si las fracciones 1 y 4 obtenidas en la contracorriente evidenciaban efectos ansiolíticos. Para ello se utilizó este test, cuyos parámetros conductuales se encuentran ampliamente validados (Pellow y col, 1985). Se inyectó ip a ratones, con las fracciones 1 y 4 en el equivalente a 1g de la planta original. Los tres experimentos realizados mostraron un considerable grado de dispersión, pero es indudable que no produce, en tal dosis, un efecto ansiolítico puesto que no aumenta el grado de exploración específica a las ramas abiertas cargadas del componente adversivo (espacio abierto y elevado)(fig 36).

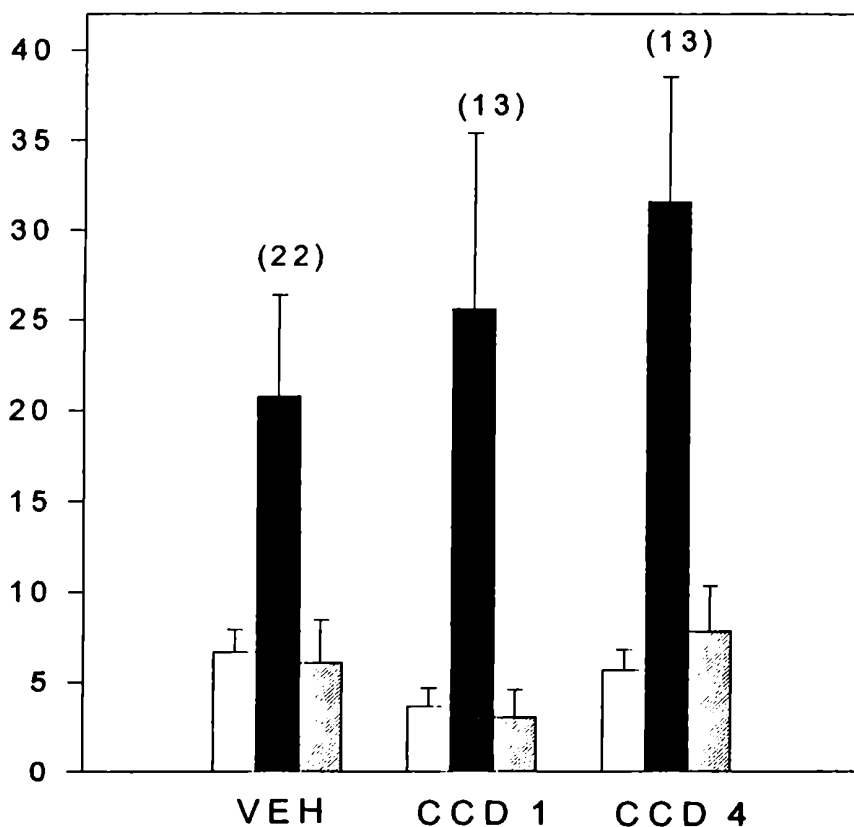


FIG 36: Media \pm ES del número de entradas totales (barras blancas), del % de entradas a ramas abiertas (barras negras), o del % de tiempo (segundos) en ellas (barras rayadas). El test del laberinto en cruz elevado se realizó en ratones, luego de 15 min de la inyección ip de vehículo (VEH), o de dos fracciones del extracto de *Salvia guaranítica* resultantes de la CCD (1 y 4). La dosis administrada fue equivalente a 1 g del material de partida. No se observaron diferencias significativas, ANOVA.

Test del alambre:

Las fracciones 1 y 4 no evidenciaron relajación muscular en los animales, puesto que ellos pudieron permanecer tomados del alambre de igual modo que los controles. La dosis utilizada fue del equivalente a 3g de planta original (fig 37).

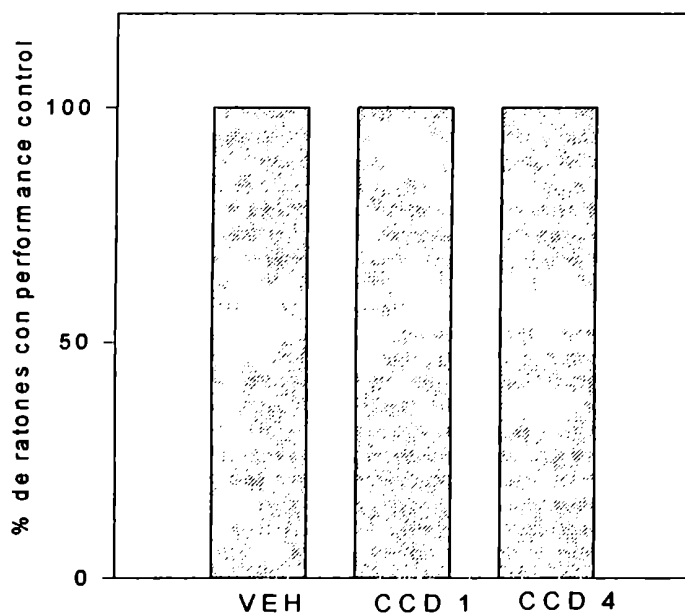


FIG 37: Comportamiento de los ratones en el test del alambre horizontal, 15 min luego de una inyección ip de vehículo (VEH) o de dos de las fracciones de *Salvia guaranítica* obtenidas de la CCD (1 y 4). La dosis inyectada fue equivalente a 3 g del material original por animal. El test requiere de dos entrenamientos previos.

Test de holeboard:

Para testear si las fracciones 1 y 4 de la contracorriente eran capaces de provocar algún efecto depresor sobre el SNC, se sometió a los ratones a la prueba exploratoria en campo abierto con agujeros. Este test es muy sensible en la medición de conductas sedativas (File y Pellow, 1985a). Se administró ip el equivalente a 3g de planta por fracción considerada y los resultados se muestran en la fig 38.

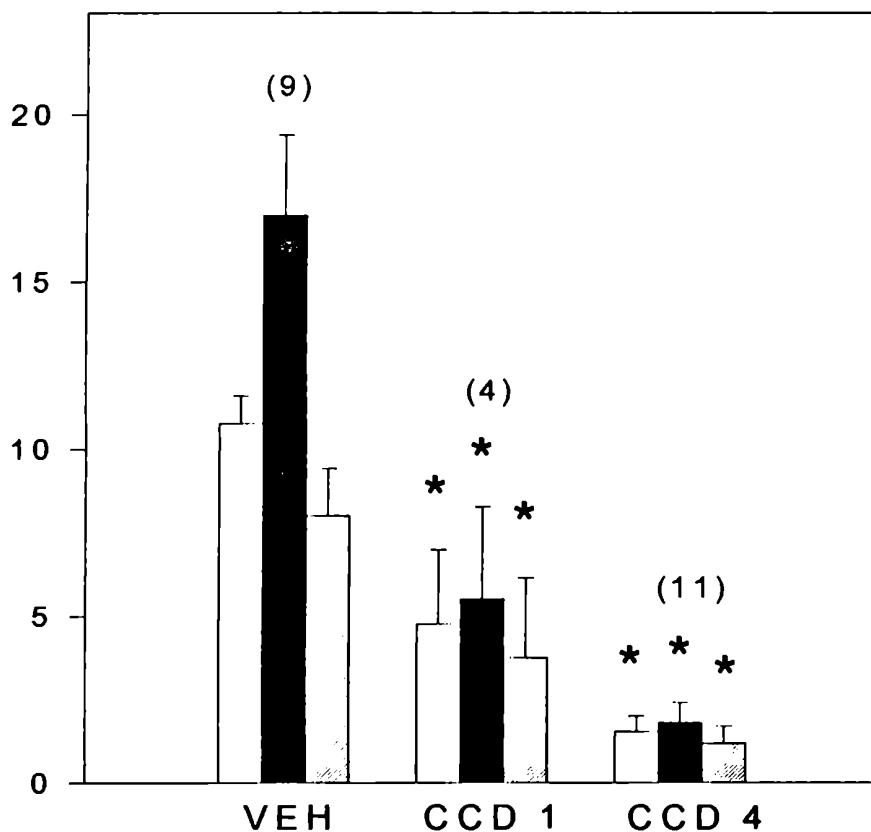


FIG 38: Media \pm ES del número de exploraciones en los agujeros (barras blancas), del tiempo de exploración a ellos (barras negras) o del número de "rearings" (barras rayadas), registrados durante 5 min en el test del "hole board". El test se realizó luego de 20 min de la inyección ip de vehículo (VEH) o de dos fracciones de *Salvia guaranítica* obtenidas de la CCD (1 y 4). La dosis administrada fue equivalente a 3 g del material de partida. * $p < 0.001$, test de Dunnett, luego de ANOVA.

El efecto observado es consistente, ambas fracciones son sedativas, pues disminuyen los parámetros registrados, el número y tiempo de exploración a los agujeros y los rearings ($p < 0.001$).

Consecuentemente, a pesar de no interferir en la tonicidad muscular (fig 37), ni disminuir la actividad locomotora (fig 35), fueron muy efectivas en reducir el grado de actividad exploratoria, lo cual indica un claro efecto sedativo (fig 38).

Como resultó más eficiente la fracción 4 (que además mostró efectos potenciadores del sueño inducido por pentobarbital, ver fig 41), se decidió continuar con ella purificando sus principios activos.

Purificación de la fracción 4:

Se sometió al material que corrió al frente en la contracorriente, a una cromatografía en columna C18 preparativa. Se utilizó un gradiente lineal entre 20-80% ACN en 70 min. Se dividió la corrida en 4 fracciones, denominadas A,B,C y D (fig 39).

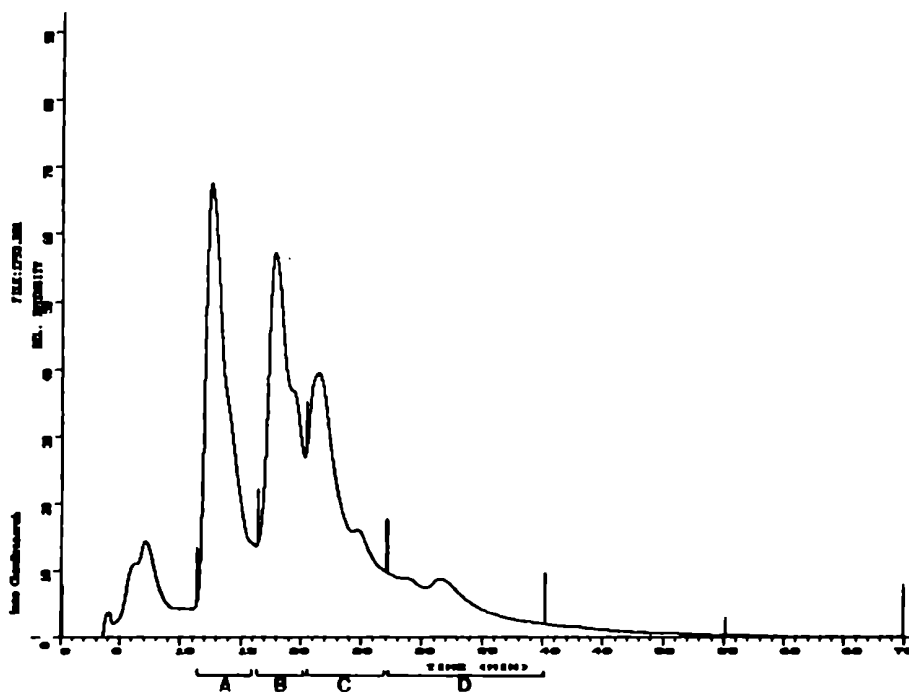


FIG 39: HPLC en una columna C18 preparativa de la fracción CCD 4. La elución se realizó con un gradiente lineal entre 20-80% de ACN en 70 min. La inhibición de la unión específica de $^3\text{HFNZ}$ al RCBZD fue de 47, 70 y 50% para las fracciones B, C y D respectivamente (con el equivalente a 1g del material de partida).

Con el equivalente a 1g de material original por fracción, se observó que el grado de inhibición a la unión de 3H FNZ al RCBZD era de 47, 70 y 50% para las fracciones B,C y D respectivamente. Se procedió a su caracterización farmacológica.

Test de holeboard:

Administrando la misma cantidad de material (equivalente a 3g de planta) utilizada para el paso previo de purificación (fracción 4 de la contracorriente), ninguna de las tres fracciones resultantes estudiadas (B,C y D) evidenciaron efectos sedativos (fig 40).

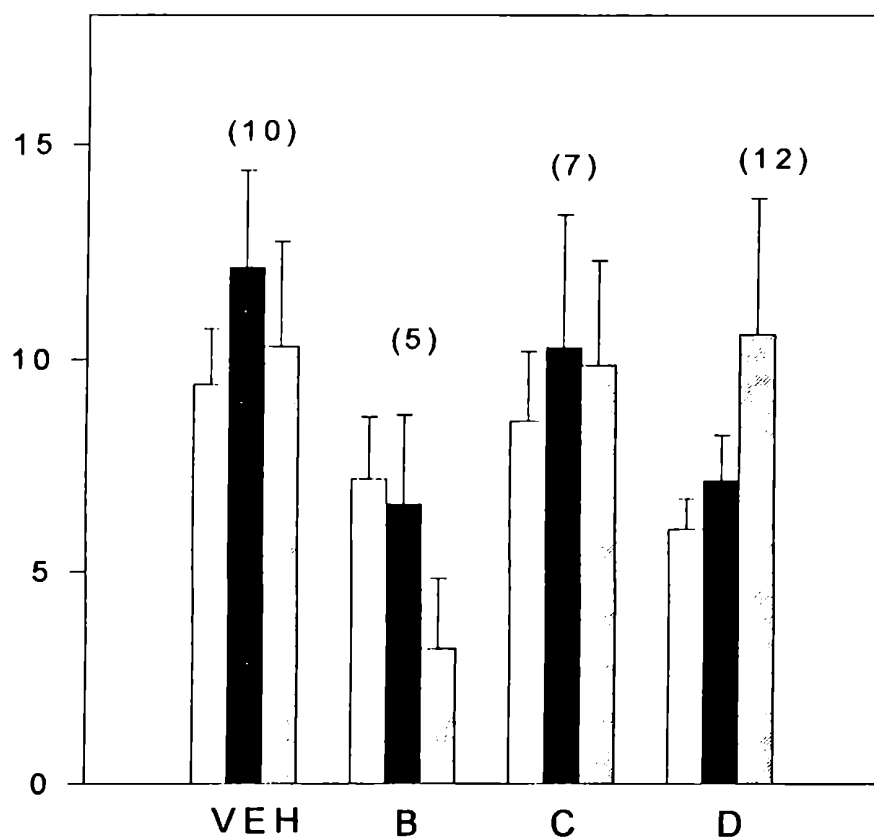


FIG 40: Media \pm ES del número de exploraciones a los agujeros (barras blancas), del tiempo de exploración a los agujeros (barras negras) o del número de "rearings" (barras rayadas), registrados durante 5 min. El test del "hole board" se realizó luego de 15 min de la inyección ip en ratones de las fracciones resultantes de la purificación por HPLC (fig 39). La dosis administrada fue equivalente a 3 g de material de partida. No se observaron diferencias significativas, ANOVA.

Potenciación del sueño inducido por pentobarbital sódico:

Se seleccionó la realización de esta prueba, debido a que las drogas que actúan positivamente sobre el sueño natural o inducido, son consideradas sustancias con efectos depresores sobre el SNC. El perfil farmacológico de los extractos testeados aparenta tener estas propiedades.

El experimento se planea logrando un estado subhipnótico en los animales. Para ello se estandariza una dosis adecuada de pentobarbital sódico y se lo administra ip. El registro de la actividad locomotora espontánea pasados 20 min, demuestra claramente que el ratón está despierto y alerta. La administración ip previa al anestésico, de una BZD en dosis altas (3 mg/kg), induce al animal a conciliar el sueño, ello se traduce en la falta de locomoción, ya que el ratón queda "planchado" en la caja de testeo. (fig 41)

Se inyectó el equivalente a 3g de planta, ya sea de la fracción cruda número 4 obtenida de la contracorriente, como las fracciones B,C o D que surgen de su purificación por HPLC. Todas dificultan la actividad locomotora del animal al que se le presenta el conflicto entre dormir o recorrer el medio ambiente nuevo de la caja de testeo (fig 41).

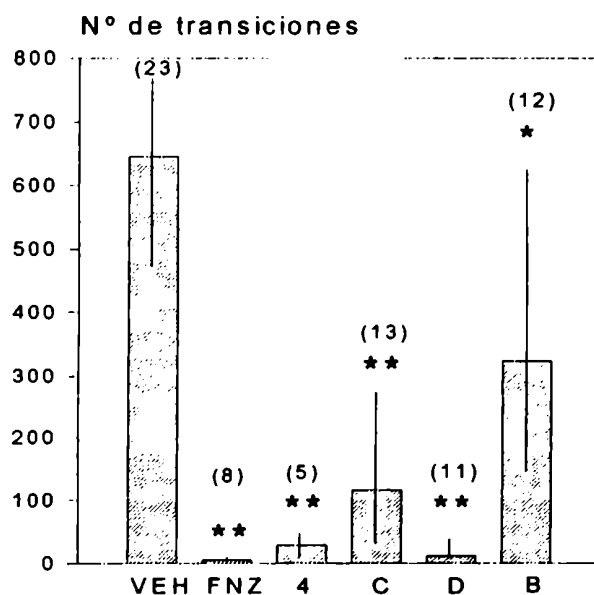


Fig 41: Mediana (rangos intercuartiles) de la actividad locomotora ambulatoria registrada durante 5 min. El test se realizó en ratones luego de la inyección ip de vehículo (VEH), flunitrazepam (FNZ 3 mg/kg), la fracción 4 de la CCD y las fracciones de HPLC (fig 39) (dosis equivalentes a 3 g del material de partida), 15 min previos a la inyección de una dosis subhipnótica de pentobarbital sódico (22 mg/kg). Luego de 20 min se registra la actividad locomotora ambulatoria. * $p < 0.02$, ** $p < 0.002$, test de Mann Whitney.

Como las fracciones C y D mostraron casi la misma eficiencia que la de la contracorriente 4, se las juntó y se prosiguió a una nueva etapa de purificación.

Purificación de las fracciones C+D:

Se juntan las fracciones C y D de la fig 39 y se las sometió a una cromatografía de HPLC en columnas C18 semipreparativas eluyendo con un gradiente lineal de 20-40 % ACN en medio ácido (0.1% trifluoracético) en 45 min.

Se distribuyó el material en cinco fracciones, denominadas 1,2,3,4 y 5 (fig 42), que presentan una inhibición de ^3H FNZ al RCBZD igual al 43, 29, 50 24 y 27% respectivamente cuando se incubaba con el equivalente a 1.5g de planta original por fracción en cada tubo de ensayo.

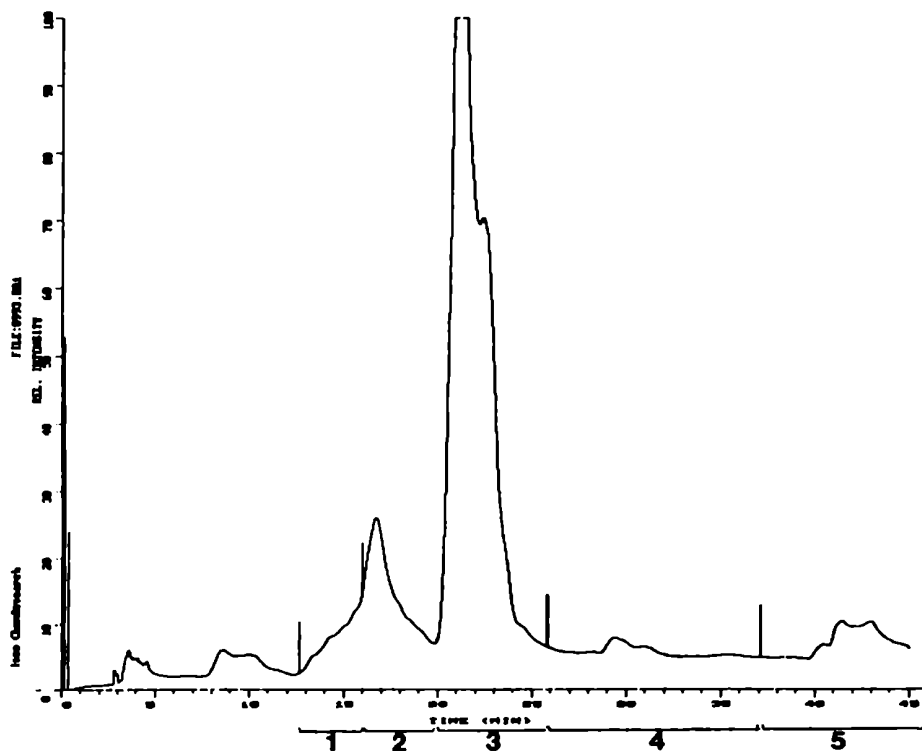


FIG 42: HPLC en una columna C₁₈ semi-preparativa de las fracciones C+ D juntas, de la fig 39. La elución se realizó en un gradiente lineal de entre 20-40% de ACN en 0.1% de TFA en 45 min.

Caracterización farmacológica de las fracciones:

Debido al perfil cromatográfico del material de la fig 42, se juntan las fracciones 1+2 y 4+5.

Test de holeboard:

Administrando el equivalente a 5g, sólo la fracción 3 disminuyó los parámetros registrados en este test (fig 43), hecho que evidencia su efecto sedativo.

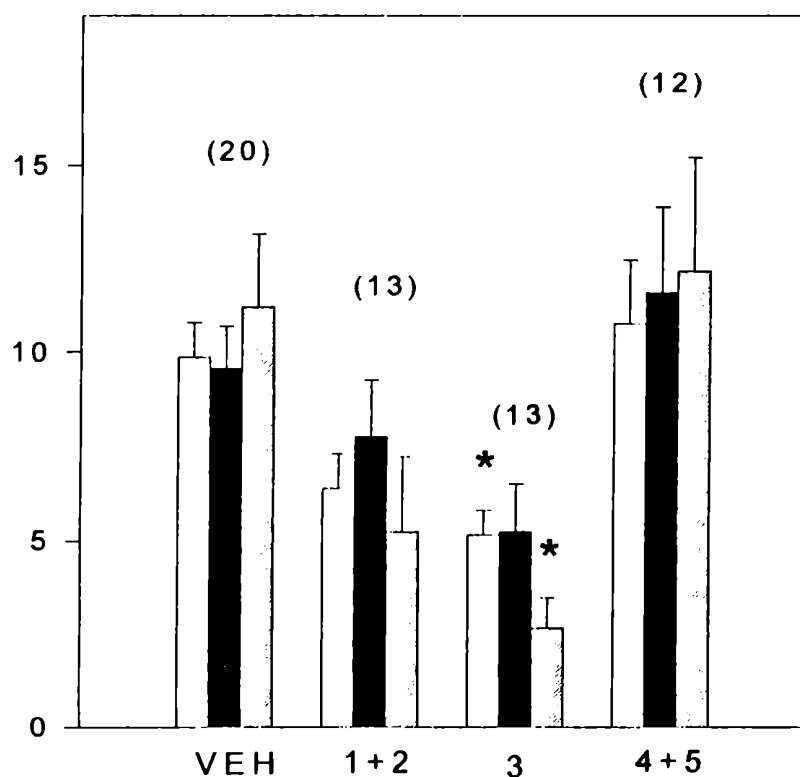


FIG 43: Media \pm ES del número de exploraciones a los agujeros (barras blancas), del tiempo de exploración a ellos (barras negras) o del número de "rearings" (barras rayadas), registrados durante 5 min en el test del "hole board". El test se realizó en ratones luego de 15 min de la inyección ip de vehículo (VEH) o de las fracciones resultantes de la purificación por HPLC (fig 42). La dosis administrada fue equivalente a 5 g del material de partida. * $p < 0.01$, test de Dunn's.

Potenciación del sueño inducido por pentobarbital sódico:

Siguiendo la misma metodología redactada más arriba, se observó que la administración ip de las diferentes fracciones en el equivalente a 5g de planta, permiten que el animal camine sin dificultad, indicando que no potencian la dosis subhipnótica del anestésico (fig 44). Se realizó el control con flunitrazepam 3 mg/kg quien demostró ser una efectiva droga hipnótica (fig 44). Sin embargo resultó atractivo aumentar la cantidad administrada de la fracción 3, ya que los experimentos mostraron una gran dispersión, donde la mitad de la población ensayada daba claros principios de hipnosis. Inyectando el equivalente a 10g de planta se evidenció consistentemente el efecto potenciador del sueño inducido por pentobarbital sódico de la fracción 3 (fig 44).

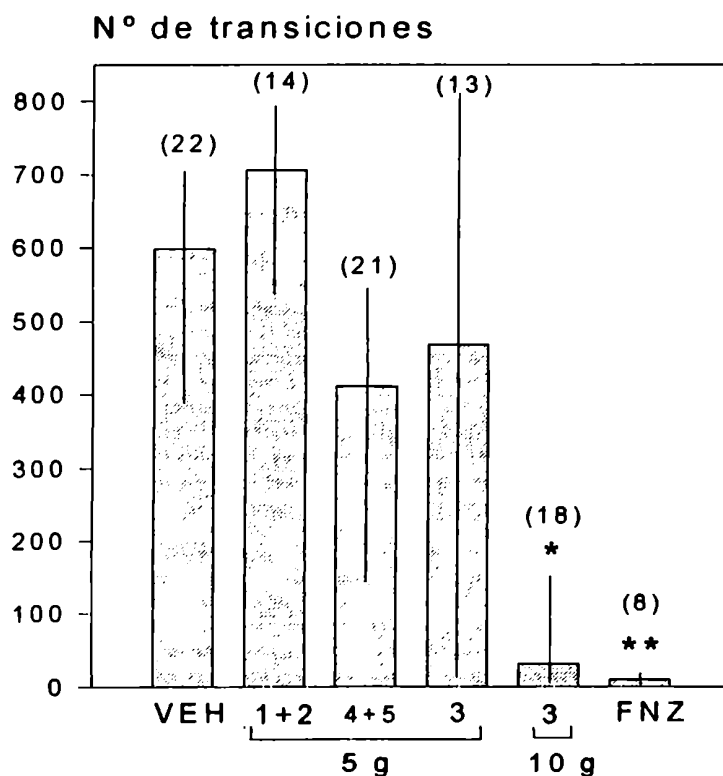


FIG 44: Mediana (rangos intercuartiles) de la actividad locomotora ambulatoria registrada en ratones durante 5 min. El test se realizó luego de la inyección ip de vehículo (VEH), flunitrazepam (FNZ 3 mg/kg) o las fracciones obtenidas en el HPLC de la fig 42 (en dosis equivalentes a 5 o 10 g del material de partida), 15 min previos a la inyección ip de una dosis subhipnótica de pentobarbital sódico (22 mg/kg). Luego de 20 min se registra la actividad locomotora ambulatoria. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, test de Dunn's.

Perfil bioquímico de desplazamiento de ^3H FNZ al RCBZD por la fracción 3:

Para demostrar si la inhibición de la unión de ^3H FNZ al RCBZD por la fracción 3 es específica y encontrar la concentración del compuesto necesaria para desplazar a la BZD en un 50% de los sitios a los que se unió, se fija una concentración de la droga marcada (0.7 nM) y se aumenta progresivamente el supuesto inhibidor (en este caso el pico 3 en concentraciones estimadas desde 10-300 μM). Considerando que la sustancia tiene características de absorción al UV propias de los flavonoides, asignándole un PM probable de 300Da, la IC_{50} del compuesto se encuentra cercana a 200 μM (fig 45).

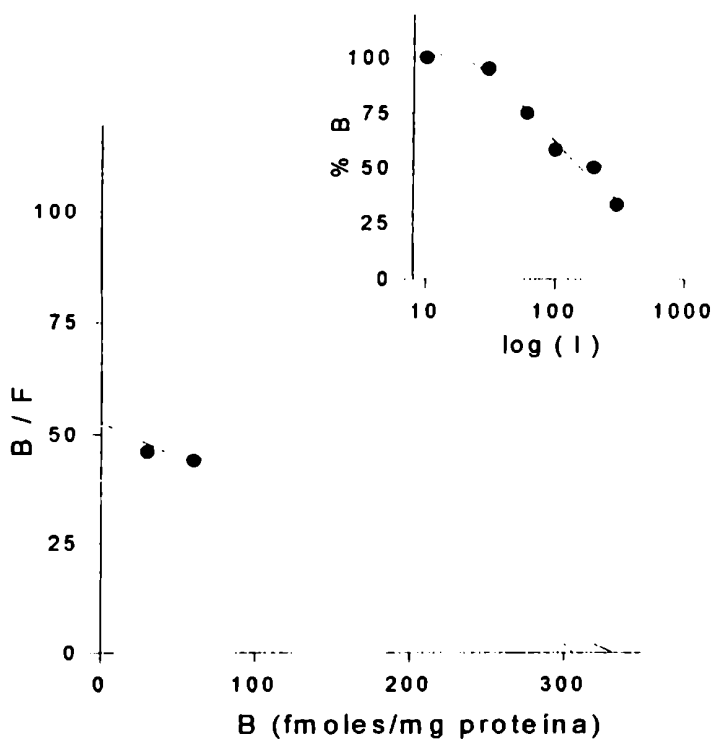


FIG 45: Gráfico de Scatchard de la unión de ^3H FNZ (0.3-10 nM) a membranas sinaptosomales de corteza cerebral de vaca, en ausencia (I.) o presencia del inhibidor (●).

Inserto: Curva de desplazamiento de la unión de ^3H FNZ por el inhibidor.

DISCUSION

Se han aislado e identificado a partir de diferentes especies de *Salvia*, moléculas que presentan afinidad hacia receptores en el complejo GABA_A. El extracto acuoso etéreo de la raíz de *Salvia miltiorrhiza* contiene un compuesto llamado miltirona que se une de manera mixta al RCBZD en el orden de afinidad μM . La miltirona evidencia su efecto ansiolítico por el aumento de cruces con castigo en el test de los cuatro platos, pero no produce sedación, tanto en administración aguda como crónica (Lee y col, 1991). Los autores la postulan como agonista parcial del RCBZD basados en la tasa de aumento en la afinidad por el receptor en presencia de GABA y farmacológicamente en el bloqueo parcial del efecto ansiolítico del diazepam. Lo interesante de ese trabajo es haber logrado la identificación de una sustancia pura partiendo de un extracto crudo y su caracterización bioquímica y farmacológica. Esta tarea presenta serias dificultades, en muchos casos de tipo técnico, que se analizarán en la discusión general.

Moléculas diterpénicas fueron aisladas a partir de extractos de material aéreo de *Salvia officinalis* (Rutherford y col, 1992). Estas sustancias inhiben competitivamente la unión de TBPS a su receptor, ubicado en el canal de Cl⁻ del complejo GABA_A. Sin embargo no desplazan la unión de ³H muscimol al receptor de GABA o de ³H FNZ al RCBZD. No se conoce el impacto funcional de este hecho, pero la dilucidación de la actividad del compuesto contribuirá a una explicación del uso medicinal de esta planta.

El presente trabajo de tesis adiciona más datos sobre el estudio de especies de *Salvia* en relación a su bioquímica con el RCBZD y sus acciones sobre el SNC.

Los resultados presentados permiten descartar efectos ansiolíticos en extractos del material aéreo de *Salvia guaranitica*. Este hallazgo conduce a dos reflexiones:

- 1) los efectos ansiolíticos observados en una especie de *Salvia* no son extensivos a otras especies, que pueden carecer de la sustancia activa o de las cantidades adecuadas,
- 2) demuestra internamente, que no todos los extractos crudos testeados se comportan de igual modo y que esta planta aparenta tener un perfil diferente a las anteriores, con características opuestas y sedativas.

El seguimiento bioquímico de la diferentes fracciones purificadas por contracorriente indicó que las sustancias con mayor coeficiente de partición, tanto a la fase inferior como la superior de la cromatografía, son las más activas en inhibir la unión de ³H FNZ al RCBZD. La subsiguiente caracterización farmacológica evidenció que la denominada fracción 4 no poseía efectos ansiolíticos, pero sí marcados efectos sedativos y podía potenciar el sueño inducido por pentobarbital sódico. Clásicamente se cuantifica la respuesta hipnótica por la medición del

tiempo de sueño logrado por la inyección de barbitúricos (pentobarbital sódico, hexobarbital) y prolongado o reducido por la droga que se desea testear; la recuperación del reflejo de enderezamiento del animal indica cuando se despierta (Anca y col, 1992; Laguna y col, 1992; Sen y Chaudhuri, 1992; Wada y col, 1993). Otra estrategia consiste en provocar un estado subhipnótico con el barbitúrico y registrar si la droga experimental es capaz de dormir a los animales (Rolland y col, 1991). Esta fue la idea inicial, ya que se evidenciaba claramente que los extractos de *Salvia guaranítica* o las fracciones más puras, "dormían" a los ratones en sus jaulas, pero ellos conservaban el reflejo de enderezamiento y consecuentemente no se podía registrar la conducta observada por esta metodología. Se decidió medir la actividad locomotora, teniendo en cuenta que un animal no dormido totalmente puede ante el estímulo de un medio ambiente novedoso "moverse" libremente y dar valores cuantificables a través de este parámetro. Una disminución notable de la actividad locomotora, en este caso, refleja el estado hipnótico o subhipnótico del ratón.

Debido a que la fracción 4 obtenida de la contracorriente presentaba mayor potencia bioquímica y farmacológica, fue seleccionada para la posterior etapa de purificación por HPLC. Ninguna de las fracciones resultantes logró reproducir el efecto sedativo ocasionado por la suma de todas ellas en el extracto crudo del cual se las purificó. Sin embargo, debe considerarse que en cada paso del fraccionamiento se pierde material y por lo tanto la cantidad del compuesto activo por gramo de planta es menor en esta última etapa comparada con la anterior; bajo este razonamiento, hubiera sido necesario reajustar la dosis administrada.

Las fracciones C y D conservaron su eficacia en la potenciación de la hipnosis, lo cual resultó un dato suficiente para tomarlas como material de partida de una nueva purificación por HPLC. En esta etapa se separaron cinco fracciones, dos de las cuales denominadas 1 y 3 fueron las más afines al RCBZD. Con el equivalente a 5g de planta original por fracción sólo la fracción 3 evidenció efectos sedativos. Los experimentos de hipnosis resultantes de la administración de este material permiten concluir que fue efectivo en la mitad de la población de animales ensayados, es decir, posiblemente se utilizó una dosis umbral para la manifestación del efecto. La administración del doble de material (10g) permitió evidenciar con certeza su poder potenciador del sueño.

Según se puede apreciar en la fig 42 la fracción 3 es la que se encuentra en mayor cantidad pero su estructura química no ha sido aún dilucidada. Por cromatografía analítica en LKB se determinó que el pico 3 es un compuesto único, hasta ahora sólo se sabe que tiene propiedades de absorvancia UV características de los flavonoides. Por ello, al estimar un

peso molecular de aproximadamente 300Da, de la curva de inhibición de ^3H FNZ al RCBZD se obtuvo una IC_{50} cercana a $200\mu\text{M}$, sugiriendo una baja afinidad por el receptor.

El efecto farmacológico que resulta de su administración revela un perfil sedativo-hipnótico. Tal selectividad puede responder a un discriminativo reconocimiento de ciertas configuraciones del receptor, que puede expresarse en una vasta combinatoria de heterooligómeros. Esto ofrece una explicación mecanística para la acción específica de drogas en relación a la afinidad hacia determinados subtipos. En este contexto, el zolpidem es un compuesto que muestra preferencias hacia el tipo de receptor BZD1 (clasificación basada en la presencia de la subunidad $\alpha 1$) y se asocia tal característica al cambio del perfil farmacológico hacia efectos sedativos-hipnóticos (Schoch y col, 1992). Esta alternativa funcional podría también explicar la conducta observada por la administración de nuestro material.

La característica farmacológica del compuesto del pico 3 (con perfil depresor sobre el SNC) se opone a las acciones selectivamente ansiolíticas reportadas en otros flavonoides aislados de plantas utilizadas en la farmacopea tradicional (ver capítulos 1, 2 y 3 de esta tesis). Los resultados mostrados aquí, avalan el uso de *Salvia guaranítica* como infusión sedativa e hipnótica y proponen al compuesto presente en el pico 3 como uno de los principios responsables de dichos efectos. Creemos que la acción de esta sustancia es específica y moderada y que en el efecto farmacológico del extracto crudo inicial, participan otros compuestos que se agregan, potencian o sinergizan a los observados en la fracción 3.

CAPITULO V

**RELACION ESTRUCTURA-FUNCION DE LOS FLAVONOIDES
COMO LIGANDOS DEL RCBZD**

RESULTADOS

En capítulos anteriores se han presentado una serie de evidencias que demuestran que algunos flavonoides como la crisina (5,7 diOH flavona) y la apigenina (5,7,4' triOH flavona), forman parte de una nueva familia de ligandos del RCBZD con un perfil farmacológico bien definido.

Estos flavonoides presentan acciones ansiolíticas a dosis semejantes a las utilizadas por las BZD pero no poseen efectos sedativos o miorelajantes.

Debido a que la crisina y la apigenina son derivados hidroxilados de la flavona, se realizó la caracterización bioquímica y farmacológica de esta estructura básica.

Los experimentos de inhibición de la unión específica de ^3H FNZ al RCBZD demostraron que una concentración de $1\mu\text{M}$ de flavona es requerida para desplazar el 50% de los sitios receptores marcados radioactivamente (tabla 7).

Experimentos farmacológicos con flavona:

En el test del laberinto en cruz elevado, la administración ip de flavona (1 y 3 mg/kg) mejoró la exploración específica de los ratones a las ramas abiertas, sin modificar la exploración general (ramas totales visitadas), lo cual evidenció la acción ansiolítica de la droga a tales dosis (**% número de entradas a ramas abiertas**: VEH: 13.11 ± 3.32 FLA 1mg/kg: 24.16 ± 4.23 * FLA 3mg/kg: 29.9 ± 4.76 **; **% tiempo en ramas abiertas** :VEH: 4.32 ± 1.29 FLA 1mg/kg: 10.53 ± 2.61 * FLA 3mg/kg: 15.16 ± 3.68 **; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, test de Dunnett luego de ANOVA).

Los test conductuales realizados para evaluar conductas sedativas y miorelajantes (hole board y alambre) permitieron demostrar que la flavona (3 y 10 mg/kg, ip) no modificó el comportamiento de los ratones y las mediciones no fueron significativamente distintas a las de los valores controles.

Estos datos permiten concluir que las propiedades farmacológicas y bioquímicas de la flavona no difieren sustancialmente de las de la crisina o apigenina.

Con el propósito de evaluar si otros flavonoides, naturales o sintéticos, reconocen al RCBZD y poseen efectos ansiolíticos, se estudiaron compuestos derivados de la crisina y apigenina, tanto en el desplazamiento de la marca específica de ^3H FNZ a membranas del SNC, como en el efecto testeado en el laberinto en cruz elevado, realizando administraciones ip a ratones (ver tabla 7).

TABLA N° 7: MEDICION DE IC₅₀ Y POTENCIA ANSIOLITICA DE UNA SERIE DE FLAVONOIDES DERIVADOS DE LA CRISINA Y LA APIGENINA.

FLAVONOIDE DERIVADO DE:	IC ₅₀	DOSIS ANSIOLITICA (mg/kg)
CRISINA	3	1
2'Cl	9	1
2'F	8	3
7 CH ₃ O	50	nd
7 CH ₃ O, 2'Cl	>100	nd
3 OH (galangina)	>100	nd
5,7 diCH ₃ O	>100	nd
5,7 diCH ₃ O, 6OH	>100	nd
5,7 diCH ₃ O, 6 benzoiloxi	>100	nd
APIGENINA	4	3
3 OH (kaempferol)	93	--
3' OH (luteolina)	>100	nd
3,3' diOH (quercetina)	>100	nd
3, 3', 5' triOH (miricetina)	>100	nd
3 OH, 2' OH (morina)	>100	nd
4' CH ₃ O (acacetina)	>100	nd
3 Oglu ramnósido, 3' OH (rutina)	>100	nd
7 Oglu ramnósido (roifolina)	>100	nd
3 Oglu, 3' OH (isoquercetina)	80	nd
FLAVONA Y OTROS	1	1-3
3,7,3',4' OH (fisetina)	>100	nd
1,3-difenil-2 propano-1 ona (chalcona)	>100	nd
3 OH (flavonol)	>100	nd
bi 3 OH (biflavonol)	>100	nd
3, 3', 4', 5, 7 flavan-pentol (catequina)	>100	nd

-- = no posee efecto
nd= no determinado

DISCUSION

Como se desprende de la tabla 7, la incorporación de halógenos (Cl^- o F^-) en la posición 2' de la estructura de la crisina, no altera radicalmente el patrón de características bioquímicas (ya que conserva una afinidad por el RCBZD del orden μM), o la potencia para provocar efectos ansiolíticos.

La idea de incorporar halógenos a determinadas estructuras flavonoideas, surge como consecuencia de analizar la alta afinidad de la BZD a su receptor central. Las BZD son estructuras químicas que se componen de heterociclos de C con N y, al igual que los flavonoides, de anillos aromáticos; pero presentan la particularidad de poseer residuos halogenados (como por ej.: Cl^- y F^-). Los dos ejemplos de flavonoides monohalogenados (sintetizados por el Dr Cassels de la Universidad de Chile) son los primeros de una serie de compuestos diseñados para testear tal hipótesis. Sustituciones en otros residuos y en otras estructuras serán necesarias para extraer conclusiones más precisas y poder establecer que posiciones en la molécula permiten mayor interacción con el RCBZD; en este capítulo sólo se encontraron relaciones entre la estructura y la función de algunos flavonoides representativos.

Por otra parte, el reemplazo de los grupos hidroxilo por los metoxilo en las posiciones 5 y 7, ocasiona cambios drásticos en la afinidad por el RCBZD, disminuyéndola más de 30 veces. Es evidente que la presencia, en esos sitios, de grupos más voluminosos y menos polares, disminuyen la unión al receptor y la sustitución en sólo uno de los carbonos (7), la perjudica en un término medio.

La posterior presencia en los compuestos di metoxilados de sustituyentes en el residuo 6, no mejora el perfil bioquímico de la estructura, conservando una IC_{50} por el RCBZD superior a $100\mu\text{M}$.

Cuando se testean moléculas que poseen un hidroxilo en el residuo 3, la IC_{50} de la estructura derivada de la crisina (galangina), tanto como la que resulta de la apigenina (kaempferol), se altera perjudicialmente. En rasgos generales, se evidencia que todos los compuestos ensayados en esta oportunidad que poseen la posición 3 indistintamente hidroxilada o glicosilada, pierden la posibilidad de unirse más efectivamente al RCBZD.

También se observó que cuando a la apigenina se le suma otro hidroxilo o metoxilo más (caso de luteolina o acacetina), la afinidad por el receptor disminuye notablemente, lo que probablemente condicione a las estructuras con mayor número de sustituciones a ser ligandos poco potentes del RCBZD.

Los experimentos realizados con flavona (estructura básica no sustituida) demuestran que la presencia de hidroxilos no es condición necesaria, tanto para unirse al receptor, como para provocar ansiolisis. Sin embargo, evaluando todos los experimentos realizados, se encuentran puntos en común:

- sólo aquellos flavonoides que poseen moderada afinidad por el RCBZD (entre 1-10 μM) fueron agentes ansiolíticos en dosis semejantes a las utilizadas por las clásicas BZD,
- los flavonoides con baja afinidad por el RCBZD (cercanas o mayores a 100 μM), carecen de propiedades ansiolíticas (conclusión basada en los experimentos con kaempferol).

En otras acciones reportadas para algunos flavonoides, se observa que existe una relación estructura-función semejante a la presentada en nuestros experimentos. Por ejemplo el efecto antiperoxidativo requiere la presencia de OH en posiciones 5,7,3',4'; por este motivo el kaempferol es antiperoxidante y la flavona es inactiva (Salayre, 1988).

Los ejemplos precedentes demuestran que las distintas acciones de los flavonoides dependen de diferentes requerimientos estructurales.

Según lo discutido, no se han testeado moléculas que superen la potencia de aquellas encontradas naturalmente en las plantas seleccionadas para el presente estudio. Es de interés, por el contrario, encontrar óptimas condiciones estructurales para favorecer la unión ligando-receptor y el desarrollo de su posterior efecto farmacológico.

En la bibliografía se reporta el caso de un biflavonoide llamado amentoflavona formado a partir de la unión de dos apigeninas, combinación que permite aumentar 2000 veces la potencia hacia el RCBZD en relación a la mostrada por el monoflavonoide. La amentoflavona desplaza la unión específica de ^3H FNZ al RCBZD con un mecanismo mixto competitivo-no competitivo (es decir, altera ambos parámetros: la $B_{\text{máx}}$ y la K_d) y presenta una relación 1.4 entre la IC_{50} calculada en ausencia respecto a la presencia de GABA. Tal propiedad le confiere características de agonista parcial de dicho receptor (Nielsen y sol, 1988). Debido a que este biflavonoide se aisló a partir de una tintura alcohólica (obtenida de la mezcla de varias plantas) utilizada contra la ansiedad, la epilepsia, como sedativa e hipnótica (Chakravarthy t col, 1981; Nielsen y col, 1988), se realizaron una serie de ensayos neurofarmacológicos. Amentoflavona no mostró tener efectos estimulantes, depresores ni analgésicos sobre el SNC, cuando se la administra por vía ip en soluciones acuosas (Chakravarthy y col, 1981). Sumado al hecho que no se observó en experimentos in vivo la inhibición de la unión de ^3H FNZ por la administración ip posterior de amentoflavona (Nielsen y col, 1988), se sugirió que no penetra la barrera hematoencefálica y consecuentemente la farmacología clínica de la tintura alcohólica no responde a la presencia de este flavonoide. Por

el contrario, resultó efectiva como espasmogénica, antiinflamatoria, cardiotónica y antiulcerogénica (Chakravarthy y col, 1981; Goel y col, 1988).

Sin embargo, no se encuentra claramente establecida la farmacocinética de la biflavonoides mientras que en otro estudio con tres biflavonoides aislados de *Taxus baccata*, reproducen los efectos potenciadores del sueño, hipnóticos y depresores de la actividad locomotora espontánea, reportados en los extractos crudos de la planta (Vohora y col, 1980). Estos datos aparentemente contradictorios, acerca de los efectos centrales de los flavonoides, merecen ser esclarecidos.

Esta discusión permite reflexionar acerca del impacto funcional de los flavonoides, en relación a las sustituciones que presentan, denotando que pequeños cambios estructurales pueden abolir sus propiedades.

La importancia de este estudio radica en haber caracterizado una nueva familia de ligandos naturales al RCBZD, no emparentada con las BZD sintéticas, que presentan diferente grado de afinidad por el mismo, así como potencialidades farmacológicas específicas, según los grupos químicos que posea la estructura base. La clave de los alcances farmacológicos ventajosos, específicos en su acción ansiolítica pero no sedativa, puede deberse a un comportamiento de agonismo parcial hacia los RCBZD, y/o a la selectividad hacia un determinado subtipo de receptor. El estudio de estas alternativas permitirá establecer un marco funcional de la acción de estas drogas.

DISCUSION GENERAL

Los flavonoides constituyen una familia de compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal y son componentes infaltables de todas las partes de una planta. La calidad y la proporción de los mismos varía según la especie vegetal considerada, la parte de la planta estudiada, el lugar o la época del año seleccionados. A causa de estos factores, sólo determinadas especies poseen característicos efectos farmacológicos que son atribuidos a la presencia de ciertos flavonoides en cantidades suficientes.

Se estima que consumimos un promedio de 1 gramo de diversos flavonoides con la dieta diaria, que podría representar una dosis farmacológicamente significativa en términos generales. Una vez incorporados por la vía oral, son absorbidos en un 60% en el intestino, su concentración máxima en el plasma se logra a las 3 horas y son totalmente eliminados en la orina luego de entre 24 a 48 horas (De Feudis, 1991). En el caso de ingerir flavonoides glicosilados se favorece la absorción, debido a una mejor solubilidad en el agua, pero también la microflora bacteriana presente en el intestino (que posee ciertas enzimas: β glucosidasa, β galactosidasa o α rhamnosidasa) se encarga de liberar los grupos azúcares (Bokkenheuser y Winter, 1988).

Respecto al grado de toxicidad de los flavonoides, poco es lo que se conoce. No se evidencian signos de toxicidad con las cantidades incorporadas en las comidas. En experimentos realizados con animales se comprobó que la 3-metoxiflavona, dicloroflavano y las chalconas presentan una muy baja toxicidad (Van Hoof, 1984; Vlietinck y col 1988); sin embargo, otro flavonoide, la + catequina 3 (cianidanol), es tóxica provocando cuadros de vómitos, fiebre, diarrea, disturbios renales, hemólisis y anemia a dosis terapéuticas de 0.5 a 1 g diarios (Jaeger y col, 1988).

Esclarecer los potenciales tóxicos, mutagénicos, posibles efectos adversos y ahondar sobre la farmacocinética y dosificación, son puntos a considerar si se desea introducir a los flavonoides en la terapéutica clínica.

Antecedentes bibliográficos demuestran que los flavonoides pasan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro. Mediante bioensayos con flavonoides marcados se observó que las glándulas, el tejido ocular y las neuronas (preferencialmente del hipocampo, cuerpo estriado e hipotálamo) poseen alta afinidad por el compuesto y acumulan la marcación (Kleijnen y Knipschild, 1992). En nuestro laboratorio se realizó un experimento cualitativo de prueba para verificar si se recuperaba el flavonoide (en este caso la crisina) en el cerebro luego de inyectarlo por la vía ip. Para tal fin se inyectó 10 mg/kg de crisina ip y luego de 15 min se sacrificó al ratón y se preparó un homogenato del

cerebro con 70% de etanol. Se centrifugó y sembró parte del sobrenadante en una cromatografía en capa delgada (cloroformo, acetona 9:1) que corrió paralelamente con el estándar de crisina; de este modo pudo comprobarse la existencia de crisina en el homogenato de cerebro.

Estudios con voluntarios normales, mostraron que la administración de flavonoides con o sin grupos azúcares, alteran los registros encefalográficos de zonas temporobasal o frontal, lo cual avalaría la idea que llegan al cerebro y en consecuencia cambian la actividad eléctrica (De Feudis, 1991).

Los reportes sobre actividad en el SNC son excepcionales; se menciona la acción analgésica mediada vía receptores opiáceos de la gopipina y la acción antidepressiva de los flavonoides atribuida a la inhibición de la monoaminoxidasa (Anton , 1988). También se publicó acciones centrales de la mezcla de tres biflavonoides aislados de *Taxus baccata* , que producen disminución de la actividad locomotora, aumento en el tiempo de sueño e hipotermia (Vohora y col, 1980).

Con respecto al sistema utilizado en esta tesis para definir en el sistema nervioso la actividad bioquímica de los compuestos, el RCBZD, otros autores realizaron experimentos in vitro y presentaron resultados que demuestran la afinidad de la amentoflavona (un biflavonoide) o de varios derivados hidroxilados o metoxilados de la flavona a dicho receptor (Nielsen y col., 1988; Haberlein y col., 1994). Nuestros experimentos evidenciaron que varios flavonoides, naturales o sintéticos, desplazaron la unión específica de 3H FNZ al RCBZD de modo competitivo en experimentos in vitro. Algunos de ellos, la crisina y la apigenina, aislados de plantas utilizadas en la preparación de infusiones tranquilizantes en la medicina folklórica, poseen efectos ansiolíticos pero no sedativos o miorrelajantes, lo que las diferencia del perfil farmacológico de las clásicas BZD. El mecanismo de acción de los flavonoides permite efectivizar ciertas acciones (en este caso ansiolisis, con una potencia similar a la de las BZD), sin ocasionar efectos adversos o indeseados (aún a dosis muy altas), asignándoles así un posible rol de agonistas parciales del RCBZD, lo que ofrece una ventaja evidente desde un punto de vista terapéutico.

Los agonistas parciales del RCBZD se unen al receptor pero tienen menores efectos máximos que los agonistas totales (como por ej. el diazepam); consecuentemente son menos eficaces que ellos y no pueden potenciar en forma completa el efecto inhibitorio del GABA aún cuando el RCBZD esté completamente ocupado; además parecen no causar efectos tolerantes o desarrollar mecanismos de dependencia (Potokar y Nutt, 1994). La baja "eficacia" farmacológica de estos flavonoides permite postularlos como agonistas parciales. Otra característica de los agonistas parciales radica en atenuar la acción

farmacológica de los agonistas totales. Estos experimentos no fueron hasta el momento ensayados con la crisina o la apigenina, pero su futura ejecución aportará más elementos de juicio para clasificar a los flavonoides como agonistas parciales (Potokar y Nutt, 1994).

La medición de las conductas relativas a la ansiedad es un punto nodal en este trabajo. Existen muchas variantes para realizarla, pero la elección del test a utilizar debe ser cautelosa. Debido a que la ansiedad es un estado emocional subjetivo, es un rasgo atribuido exclusivamente al hombre y los modelos que pretenden reproducir situaciones ansiogénicas están basados generalmente en someter al animal a estímulos aversivos que generen temor (Lal y Oglesby, 1983; Greenshaw y col, 1988)

Una estrategia consiste en inducir conflicto condicionando el comportamiento con un castigo. Ello requiere periodos de privación de la comida o bebida con largos entrenamientos que utilizan shock eléctrico como estímulo condicionado y luz o tono como incondicionado. La ansiedad en este caso está condicionada a la presencia de luz o del tono, factor que suprime el comportamiento de provisión de comida o bebida.

Otra estrategia consiste en expresar la ansiedad como inhibición de respuestas conductuales de interacción social y en aprovechar el comportamiento exploratorio a situaciones novedosas o ligadas a estímulos aversivos de valor etológico (ambientes iluminados, altos, abiertos, expuestos, etc.) (Greenshaw y col, 1988).

Debido a estos factores, la elección de un test que mida conductas ansiolíticas debe contemplar las ventajas y desventajas asociadas a la metodología. La utilización del laberinto en cruz elevado ofrece la confiabilidad en el registro de parámetros relacionados con la ansiedad, tanto en ratas como en ratones (Pellow y col, 1985; Lister, 1987), habiéndose validado el diseño conductual, fisiológica y farmacológicamente (Pellow y col, 1985). Se han observado preferencialmente comportamientos de inmovilidad, defecación o aumento en los niveles de corticosterona plasmática relacionados con la exposición a las ramas abiertas y se ha demostrado que los ansiolíticos clínicamente efectivos responden a las precisiones del modelo (Pellow y col, 1985).

El laberinto en cruz elevado se basa en el componente exploratorio espontáneo del animal y utiliza como factor aversivo el espacio no protegido asociado con las ramas abiertas, más que la altura o novedad que representan las mismas (Treit y col, 1993). Este paradigma evalúa conductas relacionadas íntimamente con la etología del animal. Consecuentemente, ha demostrado ser sensible a estresores ecológicamente relevantes, tales como el olor de un predador (Zangrossi y File, 1992), el aislamiento prolongado (Rodgers y Cole, 1993) o el previo enfrentamiento a un macho dominante (Heinrichs y col, 1992).

Todas estas evidencias sumadas a que es un sistema rápido y fácil de testear, no costoso, que no requiere entrenar a los animales, ni los somete a privación de agua o comida y que es capaz de detectar conductas ansiolíticas o ansiogénicas bajo idénticas condiciones, lo convierte en un paradigma ventajoso (File y col, 1985; Dawson y Tricklebank, 1995). Sin embargo no resulta ideal, debido a que las mediciones basales presentan fluctuaciones con los días y con los diferentes laboratorios, probablemente relacionadas con la condición e historia previa de los animales, como por ej. el grado de habituación al manipuleo que tengan (File y col, 1992). Además los ratones no pueden ser retesteados debido a que los efectos ansiolíticos registrados son de corta vida, reflejando el alto grado de aversión que se genera al experimentar la exploración a las ramas abiertas (File, 1990; Treit y col, 1993); a pesar de que se piensa que el comportamiento exploratorio es plausible de habituación, este hecho no fue evidenciado en el laberinto en cruz elevado, lo cual sugiere que la no habituación a aversiones posee un significado evolutivo relevante (Treit y col, 1993).

Debe considerarse que la ansiedad no está asociada a una única base neuroanatómica (Pratt, 1992). En consecuencia, la ansiolidad observada por las drogas que actúen sobre ciertas regiones cerebrales o determinados sistemas neurales puede manifestarse conductualmente de formas diversas pudiendo ser evidenciada en algunas tareas y no en otras. Por ejemplo los agonistas $5HT_{1A}$ no muestran su comprobada acción ansiolítica cuando se los ensaya en el laberinto en cruz elevado (Dawson y Trickleban, 1995) o una BZD (midazolán), que es sensible al efecto ansiolítico medido en el laberinto en cruz elevado si se la microinyecta en el núcleo basolateral de la amígdala, pero no lo es si se la administra en el núcleo central de la amígdala donde sí mejora la conducta de escape al shock eléctrico (Pesold y Treit, 1995).

Es de destacar que las BZD no son las únicas involucradas en el control de la ansiedad. Otros sistemas de señales químicas (neurotransmisores y/o neuromoduladores) participan también en aspectos fisiológicos y farmacológicos de la expresión de la ansiedad. Las drogas afines a los receptores serotoninérgicos afectan los estados de la ansiedad, observándose que los agonistas del subtipo $5HT_{1A}$, los antagonistas de $5HT_2$ y $5HT_3$ provocan ansiolisis. Pese a esta regla general existen efectos paradójicos y objeciones respecto al aspecto de la ansiedad que se registra según la metodología utilizada (Green, 1991; Handley, 1991; Davis, 1992; Handley y Mc Blanc, 1993).

Entre otros agentes capaces de disminuir la ansiedad se encuentran los antagonistas del receptor NMDA, los agonistas parciales del receptor de glicina insensible a estricnina

(Stephens y Andrews, 1986; Trullas y col, 1989) , el neuropéptido Y actuando como agonista sobre los receptores Y1 en amígdala (Heilig y col, 1994), los agonistas del receptor nicotínico central (Brioni y col, 1992; Davis, 1992) y agonistas α_2 o antagonistas β adrenérgicos evidenciado en la disminución de la respuesta potenciada a un estímulo aversivo (Davis, 1992).

Dentro del listado de sustancias ansiogénicas se mencionan dos neuropéptidos endógenos que actúan sobre receptores cerebrales, el factor liberador de corticotrofina y la colecistoquinina (Harro y col, 1993; Heilig y col, 1994), el inhibidor de la fosfodiesterasa, la cafeína, y el bloqueante α_2 adrenérgico, la yohimbina (Baldwin y col, 1989).

En el presente trabajo pudo demostrarse que los flavonoides con efectos ansiolíticos no se unen a otros receptores testeados, tales como los muscarínicos, los α o β adrenérgicos o al gabaérgico; estos resultados sumados al hecho que la acción farmacológica es bloqueada por antagonistas del RCBZD, sugieren que el mecanismo de acción involucra a dicho receptor; en consecuencia, la ineficacia ansiolítica del kaempferol podría atribuirse a su baja afinidad hacia los RCBZD.

Los compuestos flavonoides aislados e identificados en este trabajo, pudieron ser purificados a partir de un extracto crudo inicial de las especies correspondientes; donde paso a paso se decidió cuales de sus fracciones eran seleccionadas para el posterior procesamiento. La estrategia que se utilizó para lograr reconocer compuestos activos a partir de una "maraña" de posibilidades, involucró dos conceptos lógicos:

- 1) una elección criteriosa del vegetal utilizado basada en la información etnobotánica popular o documentada;
- 2) el uso de uno de los sistemas bioquímicos involucrados en la mediación de los efectos perseguidos, cuya función fue detectar la actividad de los compuestos y guiar nuestra búsqueda de una manera organizada y sistemática (Waterman, 1993)

Cuando el sistema de estudio es un extracto, muchos son los inconvenientes y compromisos que se presentan, debido a que el seguimiento del producto puede resultar en un fracaso, particularmente si es de baja actividad o se encuentra en escasa cantidad y luego de la purificación química los resultados obtenidos son negativos. También debe considerarse que la pérdida de otro compuesto presente en el extracto puede alterar la eficacia de la sustancia específica, ya sea por colaborar con la solubilidad o por ej. aumentar la biodisponibilidad en los ensayos con animales (Anton, 1988), perturbando la reproducibilidad de las acciones observadas.

Luego de sortear los inconvenientes que surgen de "pescar en un mar de moléculas", en este trabajo se reconocieron como principios activos naturales, a una serie de sustancias pertenecientes al grupo de los flavonoides. El estudio realizado en esta tesis, sirvió para reconocer una nueva familia de ligandos al RCBZD con efectos sobre el SNC y *para tomar* estas sustancias como "drogas madres" en la búsqueda de mejorar la potencia y las ventajas sobre las BZD clásicas. En la actualidad los resultados presentados en esta tesis están siendo utilizados como base para el desarrollo de derivados sintéticos, con mayor afinidad por el RCBZD pero que conserven las mismas propiedades farmacológicas.

El "éxito" de este trabajo consistió en purificar e identificar compuestos bioquímica y farmacológicamente activos de origen natural, que sin tener relación estructural con las BZD, comparten con ellas una ventana terapéutica restringida, lo cual representa una ventajosa y novedosa alternativa en el tratamiento de la ansiedad.

A) Se ha identificado a la 5-7 dihidroxiflavona (crisina) como un principio activo de la *Passiflora coerulea* con acciones ansiolíticas, no sedativas ni miorrelajantes, mediadas por el receptor central a benzodiazepinas.

B) Se ha identificado a la 5-7-4' trihidroxiflavona (apigenina) como un compuesto activo de la *Matricaria recutita* con similares efectos farmacológicos y bioquímicos a los descritos para crisina.

C) Se ha identificado a la 5-7-3'-4' tetrahidroxiflavona (kaempferol) como un ligando de baja afinidad al receptor central a benzodiazepinas extraído de la *Tilia tomentosa*, desprovisto de acciones ansiolíticas. El "efecto tranquilizante" de las infusiones de tilo pueden ser debidas a algún compuesto aún no identificado perteneciente a la fracción que eluye entre 30-45% de acetonitrilo en nuestro sistema de HPLC, que posee efectos ansiolíticos y no sedativos.

D) Estos resultados y aquellos obtenidos con algunos flavonoides naturales o sus derivados sintéticos, permiten concluir que estos compuestos constituyen una nueva familia de ligandos del receptor central a benzodiazepinas, con un perfil farmacológico ventajoso para el tratamiento de la ansiedad.

E) No todos los compuestos naturales que reconocen al receptor central a benzodiazepinas extraídos de plantas de uso medicinal folklórico son ansiolíticos, pues una fracción con características flavonoideas purificada de la *Salvia guaranítica* posee efectos sedativos-depresores del sistema nervioso central.

BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Ghani, A.S.; El-Lati, S.B.; Sacaan, A.I. (1987) Anticonvulsant effects of some Arab medicinal plants. *Int. J. Crude Drug Res.* 25: 39-43.

- Ahtee, L. y Shillito, E. (1970) The effect of benzodiazepine and atropine on exploratory behavior and motor activity of mice. *Brit. J. Pharmacol.* 40: 361-371.

- Amat, A.G. (1982) Interés farmacológico de las "Manzanillas": principios activos, sustituyentes y estado taxonómico. *Acta Farmac. Bonaer.* (1) 1: 49-52.

- Anca, J.M.; Lamela, M.; Gato, M.A.; Cadavid, I y Calleja, J.M. (1992) Activity on the central nervous system of *Himantalia elongata*; part II *Planta Medica* 59: 101-105.

- Anholt, R.R.H.; Pedersen, P.H.; De Souza, E.B. y Snyder, S.H. (1986). The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 261: 576-583.

- Anton, R. (1988) Flavonoids and traditional medicine. En: *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular and medicine properties*, p 423-439 (Cody, V.; Middleton; Harbone y Berch, eds).

- Asano, T. y Spector, S (1979) Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous ligands for the benzodiazepine binding sites. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 76: 977-981.

- Atanassova-Shopova, S.; Roussinov, K. y Markova, M. (1969) Pharmacological studies of Bulgarian plants with a view to their anticonvulsive effect. *Bull. Inst. Physiol. Bulgar. Acad. Sci.* 12: 205-216.

- Baldwin, H.A.; Johnston, A.L. y File, S.E. (1989) Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal test of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 159: 211-215.

- Barnard, D.L.; Smee, D.F.; Huffman, J.H.; Meyerson, L.R.; Sedwell, R.W. (1993) Antiherpesvirus activity of SP-303, a novel plant flavonoid. *Chemotherapy* 39: 203-211.

- Basile, A.; Jones, E.A. y Skolnick, P. (1991) The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: evidence for the involvement of benzodiazepine receptors ligands. *Pharmacol. Rev.* 43: 27-71

- Baum, C.; Kennedy, D.L.; Forbes, M.B. y Jones, J.K. (1982) Drug utilization in the U.S. (1981) En: *Third Annual Review. Food and drug administration. Washington.*

- Benigni, R; Capra, C.; Cattorini, P.E. (1964) En: *Piante Medicinali. Clínica, farmacología en terapia.* (Inverni; Della Fefa, eds) Milano.

- Bhattacharya, S.; Siddhartha, P. y Nag Chaudhuri, A.K. (1988) Neuropharmacological studies on *Mikania cordata* root extract. *Planta Medica* 52: 483-487

- Bickel, W.K.; Hughes, J.R. y Higgins, S.T. (1990) Human behavioral pharmacology of benzodiazepine: effects on repeated acquisition and performance of response chains. *Drug Dev Res.* 20: 53-65.

- Biondi, M. (1994a) En: *Psicobiología e Terapeutica da Ansiedade na Prática médica. Manifestacoes clinicas da ansiedade.*

- Biondi, M. (1994b) En: *Psicobiología e Terapeutica da Ansiedade na Prática médica. Classificacao e epidemeologia dos disturbios de ansiedade na psiquiatria.*

- Bokkenheuser, V. y Winter, J. (1988) Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. En: *Plant flavonoids in Biology and Medicine II. Biochem, Cellular and medicinal properties* (Cody, Middleton, Harborne y Berch, eds).

- Bonetti, E.P.; Pierri, L.; Cumin, R.; Schaffner, M.; Gamzu, E.R.; Muller, R.K.M. y Haefely, W. (1982) Benzodiazepine antagonist RO 15-1788: neurological and behavioral effects. *Psychopharmacology* 78: 8-18.

- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptors subtypes. *TINS* 11: 112-116.

- Bors, W; Heller, W.; Michel, C. y Saran, M. (1990) En: *Methods in enzymology, oxygen radicals in biological systems*, p 343-355. (Packer y Glazer, eds) Academic Press, New York.
- Braestrup, C. y Squires, R.F. (1977) Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity ^3H diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3805-3809.
- Braestrup, C. y Nielsen, M. (1982) Neurotransmitter and central nervous system disease. Anxiety. *The Lancet* 1030-1034.
- Busto, U.; Sellers, E.M.; Naranjo, C.A.; Capelli, H; Sanchez-Craib, M. y Sykora, K. (1986) Withdrawal reaction after long-term therapeutic use of benzodiazepine. *N. Engl. J. Med.* 315: 854-859.
- Calvo, D.J.; Vazquez, A.E. y Miledi, R. (1994). Cationic modulation of $\rho 1$ type γ -aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12725-12729.
- Carle, R.; Dolle, B.; Muller, W y Baumeister, U. (1993) Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry (TSP LC/MS): Analysis of acetylated apigenin-7-glucosides from *Chamomilla recutita*. *Pharmazie* 48: 304-306.
- Celentano, J.J.; Gyenes, M.; Gibbs, T.T. y Farb, D.H. (1991). Negative modulation of the γ -aminobutyric acid receptors by extracellular zinc. *Mol. Pharmacol.* 40: 766-773.
- Chakraborty, D.; Mahapatra, P.K. y Nag Chaudhuri, A.K. (1986) A Neuropsychopharmacological study of *Syzygium cumini*. *Planta Medica* 46: 139-143.
- Chakravarthy, B.K.; Rao, Y.V.; Gambhir, S.S. y Gode, K.D. (1981) Isolation of Amentoflavone from *Selaginella rupestris* and its Pharmacological activity on central nervous system, smooth muscles and isolated frog heart preparation. *Planta Medica* 43: 64-70.
- Chang, H.M. y But, P.P.H. (1986) *Pharmacology and applications of chinese materia medica*, Vol I, p 255-268. World Scientific Publishing; Singapore.
- Cinco, M; Banfi, E.; Tubaro, A.; Della Loggia, R. (1983) . A microbiological survey on the activity of a hydroalcoholic extract of chamomile. *Int. J. Crude Drug Res.* 21: 145-150.

- Clark, A.J. (1937) En: Handbuch der experimentellen Pharmakologie IV: 64 Springer-Verlag.
- Collura, A.M. y Storti, N. (1971) Manual para el cultivo de plantas aromáticas, colección agropecuaria N° 18 INTA Bs. As. p 123.
- Costa, E.; Albo, H.; Favaron, M. y Maneu, H. (1989) Pharmacological implication of the allosteric modulation of neurotransmitter amino acid receptors. En: Allosteric modulation of amino acid receptors: therapeutic implications. Raven Press, New York.
- Cox, P.A. y Balick, M.J. (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery. Scintific American, p. 60-65.
- Crawley, J.N.; Marangos, P.J. y Paul, S.M. (1981) Purine-benzodiazepine interaction: inosine reverses diazepam-induced stimulation of mouse exploratory behavior. Science 211: 725-729.
- Cruz, A.P.M.; Frei, F. y Graeff, F.G. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. Pharmacol. Biochem. Behav. 49: 171-176.
- Darragh, A.; Leumbe, R.; Scully, M.; Brick, I.; O'Boyle, C. y col (1981). Investigation in man of the efficacy of a benzodiazepine antagonist. Lancet 2: 8-10.
- Davis, M (1992) The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. TIPS 13 : 35-41.
- Dawson, G.R. y Tricklebank, M.D. (1995) Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. TIPS 16: 33-36.
- De Blas, A.L.; Park, D. y Friedrich, P. (1987) Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brains studied with a monoclonal antibody to benzodiazepine. Brain Res. 413: 264-275.
- De Feudis, F.V. (1991) En: Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical application, p 4-5. Elsevier, Paris .

- Della Loggia, R.; Traversa, U.; Scarcia, V. y Tubaro, A. (1982) Depressive effects of *Chamomilla recutita* (L) Rausch, tubular flowers, on central nervous system in mice. Pharmacol. Res. Commun. 14 : 153-163.

- Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Dri, P.; Killi, C.; Del Negro, P. (1986) The role of flavonoids in the antiinflammatory activity of *Chamomilla recutita*. Prog. Clin. Biol. Res. 213: 481-484.

- Doble, A. y Martin, I.L. (1992) Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. TIPS 13: 76-81.

- Doble, J.; Canton, T.; Piot, O.; Zuadel, J.; Stutzmann, J.; Cortrel, C. y Blanchard, J. (1992) En: GABAergic synaptic transmission p 407-418 (Biggio, B; Concas, Q. y Costa, E. eds) Raven Press, New York.

- Duke, J.A. (1985) Handbook of Medicinal Herbs. CRC 3, inc ,Florida, EEUU.

- Edgard, P.P. y Schwartz, R. (1992) Functionally relevant γ -aminobutyric acid_A receptors: equivalence between receptor affinity (K_d) and potency (EC₅₀)? Mol. Pharmacol. 41: 1124-1129.

- Eidelberg, E.; Neer, H.M.; Miller, M.K. (1965) Anticonvulsant properties of some benzodiazepine derivates. Possible use against psychomotor seizures. Neurology 15: 223-230.

- Facklam, M.; Schoch, P. Bonetti, E.P. y col. (1992a) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and functional effects in vivo of four ligands of differing intrinsic efficacies. J. Pharmacol. Exp. Ther. 261: 113-121.

- Facklam, M; Schoch, P. y Haefely, W.E. (1992b) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and potentiation of γ amino butyric acid stimulated chloride flux in vitro of four ligands of differing intrinsic efficacies. J. Pharmacol. Exp. Ther. 261 : 1106-1112.

- File, S.E. (1981) Rapid development of tolerance to the sedative effects of lorazepam and triazolam in rats. Psychopharmacology 73: 240-245.

- File, S.E. (1985) What can be learned from the effects of benzodiazepines on exploratory behavior? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 45-54.

- File, S.E. (1985b) Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neurosci. Behav. Rev.* 9: 113-121.

- File, S.E. y Pellow, S. (1985a) The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br. J. Pharmac.* 86: 729-735.

- File, S.E. y Pellow, S. (1985b) No cross-tolerance between the stimulatory and depressant actions of benzodiazepines in mice. *Behav. Brain Res.* 17: 1-7.

- File, S.E.; Pellow, S. (1986a) Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacology* 88: 1-11.

- File, S.E. y Pellow, S. (1986b) En: GABAergic transmission and anxiety (G. Biggio, Costa, E. eds) Raven Press 41: 187-199.

- File, S.E. y Pellow, S. (1986c) Behavioral pharmacology of the pyrazoloquinoline CGS 9896, a novel putative anxiolytic. *Drug Dev. Res.* 7: 245-253.

- File, S.E. (1990a). The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 135-146.

- File, S.E. (1990b) One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlorodiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100: 281-282.

- File, S.E.; Andrews, N.; Wu, P.Y.; Zharkovsky, A. y Zangrossi, H. JR (1992) Modification of chlorodiazepoxide's behavioral and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 9-14.

- File, S.E. y Andrews, N. (1992) Benzodiazepine withdrawal: behavioural pharmacology and neurochemical changes. *Biochem. Soc. Symp.* 59: 97-106. *Neurochemistry of Drug Dependence* (Ed Wonnacott y Lunt).

- Forster, H.B.; Niklas, H. y Luly, S. (1980) Antispasmodic effect of some medicinal plants. *Planta Medica* 40: 309-319.

- Gallager, D. y Tallman, J. (1989) Relationship of GABA_A receptors heterogeneity to regional differences in drug response. *Neurochem. Res.* 14: 113-118.

- Gallager, D. y Wilson, M.A. (1988) En: Chloride and their modulation by neurotransmitter and drugs p 325 (eds. Biggio, G. y Costa, E) Raven Press, New York.

- Gardner, C.R. (1988) Pharmacological profile in vivo of benzodiazepine receptor ligands. *Drug Dev. Res.* 12: 1-28.

- Gherezghiher, T. y Lal, H. (1982) RO 15-1788 selectively reverses antagonism of pentilene-tetrazol-induced discriminative stimuli by benzodiazepine but not by barbiturates. *Life Sci.* 31: 2955-2960.

- Goel, R.K.; Gambhir, S.S. y Das Gupta, G. (1988) Mechanism of anti-ulcerogenic effect of amentoflavone. *Indian J. Res.* 88: 192-196.

- Green, S. (1991) Benzodiazepines, putative anxiolytics and animal models of anxiety. *TINS* 14: 101-103.

- Greenshaw, A.J.; Nguyen, T.V. y Sanger, D.J. (1988) Animal models for assessing anxiolytic, neuroleptic and antidepressant drug action. *Neuromethods*, Vol N° 10.

- Gryglewski, R.J.; Korbut, R.; Robak, J. y Swies, J. (1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 36: 317-322.

- Guidotti, A.; Forchetti, C.M.; Corda, M.G.; Konkel, D.; Bennett, C.D. y Costa, E. (1983) Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptor. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 80: 3531-3535.

- Haberlein, H.; Tschiersch, K.P. y Schafer, H.L. (1994) Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationship and in vivo studies of a plant extract. *Pharmazie* 49: 12-17.

Haefely, W (1983) The biological basis of benzodiazepine actions. *J. of Psychoactive Drugs* 13: 19-38.

- Haefely, W.E. (1989) Pharmacology of the allosteric modulation of GABA_A receptors by benzodiazepine receptor ligands. En: *Allosteric modulation of amino acid receptors: therapeutic implications*. Raven Press, New York.

- Hales, T.G. y Lambert, J.J. (1991) The actions of propofol on inhibitory aminoacid receptors of bovine adrenal medullary chromaffin cells and rat septal neurons. *Br J Pharmacol* 104: 619-628.

- Handley, S.L. (1991) Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. *Biomedical Publishing Ltd*. p 89-112.

- Handley, S.L. y Mc Blane, J.W. (1993) 5HT drugs in animals models of anxiety. *Psychopharmacology* 112: 13-20.

- Harro, J.; Vasar, E y Bradwejn, J. (1993) CCK in animal and human research on anxiety. *TIPS* 14: 244-249.

- Hausen, B.M. (1992) En: *Adverse effects of herbal drugs*, p243-248 (De Smet; Keller; Hansel y Chandler, eds) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Heilig, M.; Koob, G.F.; Ekman, R y Britton, K. (1994) Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y : role in emotional integration. *TINS* 17: 80-85.

- Heinrichs, S.C.; Pich, E.M.; Miczek, K.A.; Britton, K.T.; Koob, G.F. (1992) Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially-defeated rat via direct neurotrophic action. *Brain Res.* 581: 190-197.

- Hernandez, T.; Heninger, C.; Wilson, M. y Gallager, D. (1989) Relationship of agonist efficacy to changes in GABA sensitivity and anticonvulsant tolerance following chronic benzodiazepine ligand exposure *Eur. J. Pharmacol.* 170: 145- 155.

- Higgitt, A.; Fonagy, P. y Lader, M. (1988) Psychological Medicine. Monograph Supplement 13, Cap 1. Cambridge University Press.

- Hill, R.T. y Tedeschi, D.H. (1971) Animal testing and screening procedures in evaluating psychotropic drugs. En: An introduction to Pharmacology (Reach, R.H. y Moore, K.E. eds) New York, Raven Press.

- Holland, B.K. (1994) Prospecting for drugs in ancient texts. Nature 369: 702.

- Hollister, L.E.; Csernansky, J.G. (1990) En: Clinical pharmacology of psychotherapeutic drugs 3rd edition New York. Churchill Livingstone Inc.

- Hollister, L.E.; Muller-Oerlinghausen, B.; Rickels, K. y Shader, R.I. (1993) Clinical uses of benzodiazepines. J clin. Psychopharmacol. (13) , 6 suppl. 1.

- Hommer, D.W.; Skolnick. P y Paul, S.M.(1987) En: Psychopharmacology. The third Generation of Progress. Capitulo 86. Raven Press, New York.

- Hunkeler, W.; Mohler, H.; Pieri, L.; Jimerson, D.C.; Skolnick, P. y col (1981). Selective antagonists of benzodiazepines. Nature 290: 514- 516.

- Izquierdo, I. y Medina, J.H. (1991) GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. TIPS 12: 260-265.

- Izquierdo, I. y Medina, J.H. (1992) Neurotransmitter mechanisms in memory consolidation. Drug of Today 28:421-429.

- Jaeger, A.; Walti M.; Neftel, K. (1988) Side effects of flavonoids in medicinal practice. En: Plant flavonoids in Biology and Medicine II. Biochem, Cellular and Medicinal properties. (Cody, Middleton, Harborne y Berch, eds).

- Jerusalinsky, D.; Medina, J.H. y De Robertis, E. (1983) Lesion of the forebrain nuclei reveals possible presynaptic cholinergic muscarinic receptors in rat cerebral cortex. Neuropharmacology 22: 835-838.

- Judd, F.K.; Norman, T.R. y Burrows, G.D. (1990) Pharmacotherapy of panic disorder. *Int. Rev. Psychiatry* 2: 399-409.

- Kleijnen, J. y Knipschild, P. (1992) *Gingko biloba*. *Lancet* 340: 1136-1139

- Klotz, U. (1991) Occurrence of "natural" benzodiazepine. *Life Sci.* 48: 419-424.

- Koch, H.P.; Jager, W; Groh, U. y Plank, G. (1992) In vitro inhibition of Adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* (14) 6: 413-417.

- Krueger, K.E. y Papadopoulos, V. (1990). Peripheral type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 265: 15015-15022.

- Krueger, K.E. (1991) Peripheral type benzodiazepine receptors: a second site of action for benzodiazepine. *Neuropsychopharmacology* (4) 4: 237-244.

- Laguna, M.R.; Villar, R.; Cadavid, I. y Calleja, J.M. (1992) Effects of extracts of *Tetraselmis suecica* and *Isochysis galbana* on the central nervous system. *Planta Medica* 59: 192- 195.

- Lal, H.; Emmett Oglesby, M.W. (1983) Behavioral analogues of anxiety. *Neuropharmacol.* 12b: 1423-1441.

- Landolfi, R.; Mower, R.L. y Steiner, M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure activity relations. *Biochem. Pharmacol.* 33: 1525-1533.

- Lee, C.M.; Wong, H.N.C.; Chui, K.Y.; Choang, T.F.; Hon, P.M. y Chang, H.M. (1991) Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. *Neurosci. Lett.* 127: 237-241.

- Leuschner, J.; Muller, J. y Rudmann, M. (1993) Characterisation of the central nervous depressant activity of a commercially available Valerian Root Extract. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 43 (1) 6: 638-641.

- Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* (Berlin) 92: 180-185.

- Luddens, H. y Wisden, W (1991). Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits. *TIPS* 13: 76-81.

- Medina, J.H.; Novas, M.L y De Robertis (1983a) Changes in benzodiazepine receptors by acute stress: different effects of chronic diazepam or Ro 15-1788 treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 96: 181-184.

- Medina, J.H.; Novas, M.L.; Wolfman, C.; Levi de Stien, M. y De Robertis, E. (1983b). Benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex and hippocampus undergo rapid and reversible change after acute stress. *Neuroscience* 9: 331-335.

- Medina, J.H.; Wolfman, C.; Levi de Stein, M.; Tunelasci, O. y Houssay, A.B. (1984) Thyroid hormone regulation of adrenergic receptors and β -adrenergic responsiveness on the submandibular gland. *Life Sci.* 35: 819-825.

- Medina, J.H.; Peña, C.; Paladini, A.C.; De Robertis, E. (1988) Presence of benzodiazepine like molecules in mamalian brain and milk. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165: 547-553.

- Medina, J.H.; Peña, C.; Levi de Stein, M.; Wolfman, C. y Paladini, A.C. (1989) Benzodiazepine-like molecules as well as other ligands for the brain receptor are relatively common constituents of plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165: 547-553.

- Medina, J.H.; Paladini, A.C.; Wolfman, C.; Levi de Stein, M.; Calvo, D.; Diaz, L. y Peña, C. (1990). Chrysin (5-7 di OH flavona), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2227-2232.

- Medina, J.H.; Danelon, J.L.; Wasowski, C; Levi de Stein, M y Paladini, A.C. (1991) Production of benzodiazepine-like compounds in bovine rumen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 180: 972-981.

- Medina, J.H. y Paladini, A.C. (1993) Occurrence of benzodiazepine-like molecules, and other ligands for the benzodiazepine receptors in nature. En: Naturally occurring benzodiazepine: structure, distribution and function. Ellis Howood Pharmaceutical Technology . Capitulo 2.

- Medina, J.H.; Levi de Stein, M.; Wolfman, C. Wasowsky, C.; De Blas, A. y Paladini, A.C. (1993) In vivo formation of benzodiazepine-like molecules in mammalian brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (2): 1111-1118.

- Mehta, A.K. y Ticku, M.K. (1989). Benzodiazepine and β carboline interactions with GABA_A receptor-gated chloride channels in mammalian cultured spinal cord neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 249 : 418-423.

- Mennini, T.; Bernasconi, P.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P. (1993) In vitro study on the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA_A, benzodiazepine and barbiturate receptor in rat brain. Fitoterapia (LXIV) 4.

- Midgley, J.M. (1988) Drug development from sorcery to science. Pharm. J. 241: 358-365.

- Middleton, E.; Ferriola, P. (1988) Effect of flavonoids on protein kinasa C: relationship to inhibition of human basophil histamine release. En: Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular and medicinal properties.p 251-266. (Cody; Middleton; Harbone y Berck, eds).

- Mohler, H. y Okada, T.(1977). Benzodiazepine receptors: demonstration in the central nervous system. Science 198: 849-851.

- Mohler, H. y Okada, T. (1978) Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by ³H diazepam. Life Science 22: 985-996.

- Moody, E.J. y Skolnick, P. (1989) Chloromethiazole: neurochemical actions at the γ aminobutyric acid receptor complex. Eur. J. Pharmacol. 164: 153-158.

- Mukhin, A.G.; Papadopoulos, V; Costa, E. y Krueger, K.E. (1989). Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9813-9816.

- Ngur, D.O.; Rosenberg, H.C. y Chiu, T.H. (1990). Modulation of GABA-stimulated Cl⁻ flux by a benzodiazepine agonist and a "inverse agonist" after chronic flurazepam treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 351-356.

- Nielsen, M; Frokjaer, S. y Braestrup, C. (1988) High affinity of naturally occurring biflavonoid, amentoflavone, to brain benzodiazepine receptors in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3285-3287.

- Noble, E.P.; Wurtman, R.J. y Axelrod, J. (1967) A simple and rapid method for injecting ³H-Norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci.* 6: 281-291.

- Novas, M.L.; Wolfman, C.; Medina, J.H. y De Robertis, E. (1988) Proconvulsant and "anxiogenic" effects of N-butyl β carboline-3-carboxilate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30: 331-336.

- Nobuyuki, O.; Mikiko, S.; Akira, Y. Kovichi Tand Satoshi, T (1992) An application of HPLC for identification of Abietano-type pigment from *Salvia miltiorrhiza* and their effects on post-hipoxic cardiac contractile force in rats. *Planta Medica* 58: 571-573.

- Oja, S.S.; Korpi, E.R. y Saransari, P. (1990) Modification of chloride flux across brain membranes by inhibitory amino acids in developing and adult mice. *Neurochem. res.* 15: 797-804.

- Olasmaa, M.; Rothstein, J.D.; Guidotti, A.; Weber, R.J.; Paul, S.M.; Spector, S.; Zeneroli, M.L.; Baraldi, M y Costa, E. (1990) Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* 55: 2015-2023.

- Olsen, R y Tobin, A (1990). Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4: 1469-1480.

- Paris, R. y Theallet, J.P. (1961) *Ann. Pharm. Franc.* 19: 580.

- Paris, R.R. y Moyse, H. (1981) *Matiere Médicale*, 12: 267. Masson, Paris.

- Pearce, F.L.; Befus, A.D.; Bienenstock, J. (1984) Mucosal mast cells III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73: 819.

- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 14: 149-167.

- Pellow, S.; File, S.E. (1986a) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze. A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 525-529.

- Pellow, S. y File, S.E. (1986b) Evidence that the β -carboline, ZK 91296, can reduce anxiety in animals at doses below those causing sedation. *Brain Res.* 363: 174-177.

- Peña, C.; Medina, J.H.; Novas, M.L.; Paladini, A.C. y De Robertis, E. (1986) Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine inhibitor. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 83: 4952-4956.

- Peña, C.; Medina, J.H.; Piva, M.; Diaz, M.E.; Danilowicz, C. y Paladini, A.C. (1991) Naturally-occurring benzodiazepine in human milk. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 175: 1042-1050.

- Pesold, C. y Treit, D. (1995) The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* 671: 768-773.

- Peters, J.A.; Kirkness, E.F.; Callachan, H.; Lambert, J.L y Turner, A.J. (1988). Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br. J. Pharmacol.* 94: 1257-1269.

- Petkov, V.D.; Hadjiivanova, C. y Petkov, V.V. (1993) Effects of standardized extracts GK 501 from *Ginkgo biloba* L, G 115 from *Panax ginseng* C.A. Meyer, and their combination, incosan[®] (PHL-00701), on the brain levels of biogenic monoamines and on the serum content of prolactin, growth hormone and ACTH. *Phytother. Res.* 7: 139-145.

- Pignol, B; Etienne, A.; Crastes de Paulet, A; Derby, C. (1988) Role of flavonoids in the oxygen-free radical modulation of the immune response. En: *Plant flavonoids in biology and medicine II:*

Biochemical, cellular and medicinal properties, p173-182. (Cody; Middleton; Harbone y Berck, eds).

- Piva, M.; Medina, J.H.; De Blas, A.L. y Peña, C. (1991) Formation of benzodiazepine-like molecules in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 972-981.

- Potier, M.C.; Prado de Carvalho, L; Dadd, R.H. y col. (1988) In vivo binding of beta carbolines in mice, regional difference and correlation of occupancy to pharmacological effects. *Mol. Pharmacol.* 34: 124-128.

- Potokar, J. y Nutt, D.J. (1994) Anxiolytic potential of benzodiazepine receptor partial agonist. *CNS Drug (1) 4*: 305-315.

- Pratt, J.A. (1991) Psycotropic drug tolerance and dependence: common underlyn mechamims? En: *The biological bases of drug tolerance and dependence*.Capítulo 1. Academic Press Limited.

- Pratt, J.A. (1992) The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmac. Ther.* 55: 149-181.

- Pritchett, P.R.; Sontheimer, H.; Shivers, B.D.; Ymer, S.; Kettenmann, H.; Schofield, P.R. y Seeburg, P.H. (1989). Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338: 582-585.

- Randall, L.O. (1960) Pharmacology of methaminodeazepoxide. *Dis Nern. Syst.* 21: 7-10.

- Randall, L.O.; Heise, G.A.; Schallek, W.; Bagdon, R.E.; Banziger, E.; Boris, A.; Moe, R.A.; Albrams. W.B. (1961) Pharmacological and clinical studies of Valium, a new psichoterapeutic agent of the benzodiazepine class. *Curr. Ther. Res.* 3: 405-425.

- Raymond, L.A.; Blackstone, C.D. y Huganir, R.L. (1993) Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity. *TINS* 16: 147-153.

- Roache, J.D. y Griffiths, R.R. (1987) Lorazepam and meprobamate doses effects in humans: behavioral effects and abuse liability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 978-988.

- Roberts, E.; Chase, T.W. y Tower, D.B. (1976) En: GABA in Nervous System Function. Raven Press, New York.

- Rodgers, J.C. y Williams, D.L. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 419.

- Rodgers, R.J. y Cole, J.C. (1993) Anxiety enhancement in the murine elevated plus-maze by immediate prior exposure to social stressors. Physiol. and Behav. 53: 383-388.

- Rohmer, J.G.; Discala, G. y Saudner, G. (1990) Behavioral analysis of the effect of benzodiazepine receptor ligands in the conditioned burying paradigm. Behav. Brain. Res. 38: 45-54.

- Rolland, A.; Fleuretin, J; Lanhers, M.C.; Younos, C.; Misslin, R; Mortier, F.; Pelt, J.M. (1991). Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: Sedative and anxiolytic properties. Planta Medica 57: 212-216.

- Rosenberg, H.C. y Chiu, T.H. (1985) Time course for development of benzodiazepine tolerance and physical dependence. Neurosci. Biobehav. Rev. 9: 123-131.

- Rovati, G.E. y Nicosia, S. (1994) Lower efficacy: interaction with an inhibitory receptor or partial agonism? TIPS 15: 140-144.

- Ruckstuhl, M.; Beretz, A.; Anton, R. y Landry, Y. (1979) Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. Biochem. Pharmacol. 28: 535-538.

- Rutherford, D.M.; Nielsen, M.P.C.; Hansen, S.K.; Bergendorff, O. y Sterner, O. (1992) Isolation and identification from *Salvia officinalis* of two diterpenes which inhibit ³⁵S-TBPS binding to brain receptor chloride channel in vitro. Neurosci. Lett. 135: 224-225.

- Salvayre, R.; Negre, A.; Affany, A.; Lenoble, M.; Blazy, L. (1988) Protective effect of flavonoids analogs and vitamine E against lipid peroxidation of membranes. En: Plant flavonoids in biology and medicinell: biochemical, celluluar and medicinal properties. p 313-316. (Cody; Middleton, Harbone y Berck eds).

- Sanchez, M.P.; Dietl, M.M.; De Blas, A.L. y Palacios, J.M. (1991) Mapping of benzodiazepine-like immunoreactivity in the brain as revealed by a monoclonal antibody to benzodiazepine. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 111-121.

- Sangameswaran, L.; Fales, H.M.; Friedrich, P. y De Blas, A.L. (1986) Purification of benzodiazepine from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity human brain. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 83: 9236-9240.

- Sanneurd, C.A.; Cook, J.M. y Griffiths, R.R. (1989) Behavioral differentiation of benzodiazepine ligands after repeated administration in baboons. *Eur. J. Pharmacol.* 167: 333-343.

- Sansone, M. (1978) Effects of chlordiazepoxide, a mitriptyline, imipramine, and their combinations on avoidance behavior in mice. *Psychopharmacology (Berlín)* 59: 151-155.

- Schlichting, J.L. (1990) Modulation and polytopic signaling in GABAergic transmission. *Neurochem. Res.* 15: 131,143.

- Schoch, P.; Richards, J.G.; Haring, P. y col. (1985). Colocalization of GABA_A receptors and benzodiazepine receptors in the brain shown by monoclonal antibodies. *Nature* 314: 168-170.

- Schoch, P; Moreau, J.L.; Martin, J.R. y Haefely, W.E. (1992) Aspects of benzodiazepine receptor structure and function with relevance to drug tolerance and dependence. *Biochem. Soc. Symp.* 59: 121-134. *Neurochemistry of Drug Dependence* (Ed Wonnacott y Lunt).

- Selway, J.W.T. (1986) En: *Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*, p 521-536 (Cody; Middleton y Harbone eds) Alan R. Liss, New York.

- Sellers, E.M.; Kalant, H. (1976) Alcohol intoxication and withdrawal . *N. Engl. J. Med* 294: 757-762.

- Sen, T. y Nag Chaudhuri, A.K. (1992) Studies on the Neuropharmacological aspects of *Pluchea indica* root extract. *Phytother. Res.* 6: 175-179.

- Shader, R.I. y Greenblatt, D.J. (1993) En: *Journal of Clinical Psychopharmacology* (13) 6:1185.
- Sieghart, W (1992) GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *TIPS* 13: 446-450.
- Sigel, E.; Stephenson, F.A. (1988). A GABA/BZD receptor complex of bovine cerebral cortex: purification and partial characterization. *Biochem. J.* 249: 21-32.
- Skolnick, P.; Marangos, P.J.; Goodwin, F.K.; Edwards, M. y Paul, S.M. (1978) Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous inhibitors of ³H diazepam binding in the central nervous system. *Life Sci.* 23: 1433-1480.
- Speroni, E. y Minghetti, A. (1989) Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. *Planta Médica* 54: 488-491.
- Squire, R.F. Braestrup, C.(1977). Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266: 732-734.
- Stephens, D.M.; Andrews, J.S.; N-methyl D-aspartate antagonist in animal models of anxiety. En: *Frontiers in excitatory amino acid research*, p 309-316. (Cavalheiro; Lehmann; Turski, eds). Alan R. Liss, New York.
- Stephens, D.; Turski, L.; Hillman, N.; Turner, J.; Schneider, H. y Yamaguchi, M. (1992) En: *GABAergic synaptic transmission* p 395-405 (Biggio, B; Concas, A. y Costa, E eds.) Raven Press, New York.
- Stephenson, F.A. (1988). Understanding of the GABA_A receptor: a chemically gate ion channel. *Biochem. J.* 249: 21-32.
- Stephenson, F.A.(1993). GABA_A and glycine receptors En: *Neurotransmitter Receptors*. Elsevier Science Publishers.
- Swinson, R.P (1989) The acute treatment of anxiety and depression. *Psychiatry J. Univer. Ottawa* 14: 375-380.

- Tallman, J.D.; Thomas, J. y Gallager, D. (1978). GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature* 274: 383-395.

- Traversa, U.; De Angelis, L (1977) On the hypnogenic and anticonvulsant activities of desmethyldiazepam and chlordesmethyldiazepam: time effects relations. *J. Pharm. Pharmacol.* 29: 504-505.

- Treit, D. (1985) Evidence that tolerance develop to the anxiolytic effect of diazepam in rats. *Pharmacol., Biochem, and Behav.* 22: 383-387.

- Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. (1993) Anxiogenic Stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochem. and Behav.* 44: 463-469.

Trullas, R.; Jackson, B. y Skolnick, P. (1989) Anxiolytic properties of 1-aminociclopropanecarboxilic acid, a ligand at strychnine-insensitive glycine receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 34: 313-316.

- Unseld, E.; Krishee, D.; Fischer, C.; Katz, U. (1989) Detection of desmetyldiazepam and diazepam in brain of diferent species and plants. *Biochem. Pharmacol.* 38: 2473-2478.

- Van Hoof, L.; Vanden Berghe, D.A.; Hatfield, G.M.; Vlietink, A.J. (1984) Plant antiviral agents V. 3-methoxy-flavones as potent inhibitors of viral-inuced block of cell syntesis. *Planta Medica* 50: 513-517.

- Vlietink, A.J.; Vanden Berghe, D.A.; Haemers, A. (1988) Present status and prospects of flavonoids as anti-viral agents. En: *Plant flavonoids in biology and medicine II. Biochem, Cellular and medicinal properties* (Cody, Middleton, Harborne y Berch, eds).

- Vohora, S.B.; Kumar, I.; Shah, S.A. y Khan, M.S.Y. (1980) Effect of biflavonoids of *Taxus baccata* on the central nervous system. *Indian J. Med. Res.* 71: 815-820.

- Wada, K.; Sasaki, K.; Miura, K.; Masaaki, Y.; Kubota, Y.; Matsumoto, T. y Haga, M. (1993) Isolation of bilobalide and ginkgolide A from *Ginkgo Biloba L.* shorten the sleeping time induced in mice by anesthetics. *Biol. Pharm. Bull* (16) 2: 210-212.

- Warner, M.D.; Peabody, C.A.; Whiteford, H.A. y Hollister, L.E. (1988) Alprazolam as an antidepressant. *J. Clin. Psychiatry* 49: 148,150.

- Waterman, P.G. (1990). Searching for bioactive compounds: various strategies. *J. Nat. Prod.* 53: 13-22.

- Waterman, P.G. (1993) Natural Products from plants: bioassay guided separation and structural characterization. En: *Drugs from natural products*. Ellis Horwood series in Pharmaceutical technology (Harvey, A.L. ed).

- Welton, A.F.; Tobias, L.D.; Fieldler-Nagy, C.; Anderson, W.; Hope, W.; Meyers, K.; Coffey, J.W. (1986). The effect of flavonoids on arachidonic acid metabolism. En: *Plant flavonoids in biology and medicine*, p 231-242. (Cody; Middleton y Harbone eds).

- Wichtl, M.; Bozek, B, y Fingerhut, T. (1987) Lime flowers: isoquercetine- the main flavone of the official crude drug. *Deutsche Apotheker Zeitung* 127: 509-510.

- Wildmann, J.; Vetter, W; Ranalder, Y; Schmidt, K.; Maurer, R.; Mohler, H (1988) Occurrence of pharmacological active benzodiazepine trace amounts in wheat and potato. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3549-3559.

- Wikinski, S.; Lombardo, M.; Medina, J.H. y Rubio, M.C. (1994). Lack of anxiolytic effect of diazepam in pre-anesthetic medication. *Brit. J. anaesth.* 72: 694-696.

- Wolfman, C.; Da Cunha, C.; Jerusalinsky, D.; Levi e Stein, L.; Viola, H.; Izquierdo, I. y Medina, J.H. (1991) Habituation and inhibitory avoidance training alter brain intracerebral levels of benzodiazepine-like molecules and affected by intracerebral flumazenil microinjections. *Brain Res.* 548: 74-80.

- Woods, J.H.; Katz, J.L. y Winger, G. (1987) Abuse liability of benzodiazepine. *Pharmacol. Rev.* 39: 251-419.

- Woods, J.H.; Katz, J.L. y Winger, G. (1992) Benzodiazepine: use, abuse and consequences. *Pharmacol. Rev.* 44: 151-347.

- Yamamura, H.; Enna, S. y Kuhar, M. (1985) Neurotransmitter Receptor Binding 2da edición. Raven Press.

- Yanagibashi, K; Ohno, Y. Nakamichi, N; Matsui, T; Hayashida, K; Takamura, M; Yamada, K; Tou, S. y Kawamura, M. (1989). Peripheral type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. J. Biochem. 106: 1026-1029.

- Yasukawa, K.; Takido, M.; Takuchi, M. y Nitta, K. (1988) Effect of flavonoids on tumor promoters activity. En: Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, cellular and medicinal properties. p 247-250 (Cody; Middleton; Harbone y Berck eds).

- Ymer, S. y col (1990). Structural and functional characterization of the $\gamma 1$ subunit of GABA_A/BZD receptors. EMBO J 9: 3261-3267.

- Yu, O.; Chiu, T.H. y Rosenberg, H.C. (1988). A comparison of the effects of midazolam and pentobarbital on the dose response of GABA-gated Cl⁻ influx in rat brain microsacs. Brain Res., 451: 376-380.

- Zhang, H.; Rosenberg, H.C. y Tietz, E.I. (1989) Injection of benzodiazepine but not GABA or muscimol into pars reticulata of substantia nigra suppresses pentylenetetrazol seizures. Brain Res. 488:73.

- Zangrossi, H. JR y File, S.E. (1992) Behavioral consequences in animal test of anxiety and exploration of exposure to cat odor. Brain Res. Bull. 29: 381-388.

- Zung, W.W. (1987) Effect of clorazepate on depresser mood in anxious patients. J. Clin. Psychiatry 48: 13-14.

Las siguientes publicaciones contienen parte de los resultados presentados en esta Tesis:

- Wolfman, C.; Viola, H.; Paladini, A.; Dajas, F. y Medina, J.H. (1994). Posible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharm. Biochem. Behav.*; 47: 1-4.

- Viola, H.; Wolfman, C.; Levi de Stein, L.; Wasowski, C.; Peña, C.; Medina, J.H. y Paladini, A.C. (1994). Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (tiliaceae). *J. Ethnopharmacol.* 44: 47-53.

- Viola, H.; Wasowski, C.; Levi de Stein, L.; Wolfman, C.; Silveira, R.; Dajas, F.; Medina, J.H. y Paladini, A.C. (1994). Apigenin, a component of *Matricaria recutita* (L) flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica* (61) 4.

