

Evaluación de los efectos ansiolíticos y anticonvulsivos de un extracto diclorometánico de las partes aéreas de *Argemone ochroleuca* Sweet (Papaveraceae)

Murillo-Zavala Yareli Itzayana¹, Reyes-Gómez Ana Iris¹, Saavedra-Rangel Lizbeth Guadalupe¹, Kornhauser-Aburto Sophia¹, Rangel-Juárez Miguel Alejandro¹, Torres-Murillo Luz Aurora¹, Alonso-Castro Ángel Josabad², Villegas-Gómez Clarisa³

¹División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

²Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

³Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

¹yi.murillozavala@ugto.mx, ¹ai.reyesgomez@ugto.mx, ¹lg.saavedrarangel@ugto.mx, ¹s.kornhauseraburto@ugto.mx,

¹ma.rangeljuarez@ugto.mx, ¹la.torresmurillo@ugto.mx, ¹ma.rangeljuarez@ugto.mx, ²angeljosabad@ugto.mx, ³clarisa.villegas@ugto.mx

Resumen

Introducción. *Argemone ochroleuca* es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar síntomas relacionados con diversas enfermedades mentales. Esta planta es conocida comúnmente como “chicalote” o “amapola amarilla”, la cual es triturada y sometida a procesos de decocción para obtener sus extractos. En la actualidad no existen estudios científicos que comprueben los efectos neurofarmacológicos de esta planta.

Objetivo. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivos de un extracto diclorometánico de las partes aéreas de *Argemone ochroleuca* en ratones.

Material y métodos. Se trabajó con ratones de la cepa BALB/c, obtenidos del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas. Para evaluar los efectos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivos del extracto vegetal se usaron los modelos de caja con hoyos (Hole-Board Test), sedación inducida con pentobarbital (40 mg/kg i.p.) y convulsiones inducidas con estricnina (2 mg/kg i.p.), respectivamente. Como control negativo se usó solución salina administrada por vía oral y como control positivo se empleó clonazepam (1.5 mg/kg p.o.). El extracto se administró oralmente a dosis de 0.1, 1.0, 10, y 50 mg/kg.

Resultados. Se demostró que el extracto vegetal presentó efectos ansiolíticos en ratones con un efecto inferior que el clonazepam. El efecto ansiolítico máximo del extracto se observó desde una dosis de 1 mg/kg. El extracto no indujo efectos sedantes, pero evitó la aparición de convulsiones a dosis de 10 mg/kg.

Conclusión. El extracto de *Argemone ochroleuca* posee efectos ansiolíticos y anticonvulsivos en ratones, y no produce efectos sedantes.

Palabras clave: *Argemone ochroleuca*, efectos ansiolíticos, Hole-Board Test, sedación, convulsiones.

Introducción

El estrés es un fenómeno que moviliza las operaciones defensivas del organismo, es base para el aprendizaje, estimula el desarrollo de la personalidad, motiva el logro de metas y contribuye a mantener un elevado nivel de trabajo y conducta; en otras palabras, significa un ánimo transitorio de tensión (sentimiento), un reflejo de la toma de conciencia de un peligro (miedo), un deseo intenso (anhelo), una respuesta fisiológica ante una demanda. El trastorno mental de ansiedad es nocivo, compromete la eficacia y conduce a un estado de sufrimiento mórbido. Los trastornos de ansiedad son los más prevalentes (14,3% de la población) y los más crónicos, se caracterizan por miedo excesivo y evitación en respuesta a objetos o situaciones específicas que en realidad no representan un peligro real afectando el desempeño laboral, académico y social, además de que son un factor de riesgo para otras enfermedades fisiológicas. Con la reciente pandemia de Covid-19, la ansiedad y la depresión aumentaron significativamente por el creciente número de las noticias sensacionalistas y la desinformación, así como el miedo a infectarse por el SARS-CoV-2 [1,2,3].

Argemone ochroleuca es una planta anual o perenne de vida corta utilizada en la medicina tradicional mexicana, conocida comúnmente como “chicalote” o “amapola amarilla”. Se caracteriza por alcanzar una altura de 30 cm a 1.2 m; su tallo, con látex lechoso color amarillo, y hojas presentan un color verde azulado-blanquecinas con proyecciones espinosas. Esta especie recibe su nombre científico debido a su peculiar flor color amarillo crema con una textura parecida al papel. Se encuentra distribuida desde el centro de México hasta el sur de Estados Unidos puesto que crecen en clima cálido, semicálido, semiseco y templado, incluso en condiciones extremas como precipitaciones limitadas, altas temperaturas y en altas concentraciones de sal. Se considera maleza debido a que crece en campos abandonados o de cultivo, al igual que a la orilla de caminos [4,5,6,7,8]. Esta planta es utilizada en la medicina tradicional mexicana para aliviar infecciones oculares, tos, trastornos dermatológicos, combatir el insomnio, tratar síntomas relacionados con diversas enfermedades mentales, además de poseer propiedades anticonvulsivas, tranquilizantes, antidiabéticas y antiespasmódicas. [4,5] La planta es triturada y sometida a procesos de decocción para obtener sus extractos. En la actualidad no existen estudios científicos que comprueben los efectos neurofarmacológicos de esta planta.

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivos de un extracto diclorometánico de las partes aéreas de *Argemone ochroleuca* en ratones.



Figura 1. Planta *Argemone ochroleuca*.

Material y métodos

Animales de experimentación. Se usaron ratones BALB/c del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas. La alimentación de los ratones se realizó a base de pellets para roedor y agua a voluntad. El Comité Institucional de Bioética en la investigación de la Universidad de Guanajuato (CIBIUG) revisó y aprobó el protocolo de este proyecto (CIBIUG-P03-2020).

Material vegetal. El extracto se obtuvo por medio de sistema Soxhlet con diclorometano de las partes aéreas de la planta *A. ochroleuca* durante 2 horas.

Análisis del efecto sedante. Se seleccionaron grupos de 5 ratones y se les administró vía oral 100 μ L del extracto de *A. ochroleuca* (1, 10 y 50 mg/kg), como control negativo se usó solución salina y como control positivo clonazepam (1.5 mg/kg p.o.). Una hora después se administró 100 μ L de pentobarbital (40 mg/Kg) por vía intraperitoneal. Se midió el tiempo en el que el animal tarda en perder su estado de alerta (periodo de latencia), el cual se denominó “fase 1” y también se cuantificó la duración del sueño, el cual es desde la perdida de reflejos hasta que el ratón puede recuperar los reflejos motores (fase 2).

Hole-Board Test. Para el ensayo se usó una plataforma de madera cerrada con 16 agujeros de diámetros similares. Se seleccionaron grupos de 5 ratones, a los cuales se les administró 100 μ L del extracto de *A. ochroleuca* (1, 10 y 50 mg/kg), solución salina (control negativo) y clonazepam 1.5 mg/kg (control positivo). Al cabo de 45 minutos, se colocó cada ratón dentro de la plataforma agujerada en la parte central y se evaluó por 5 minutos el número de veces que cada ratón introdujo completamente la cabeza dentro de los agujeros. El aumento en el número de exploraciones sugiere un menor estado de ansiedad o una mayor actividad exploratoria [21].

Convulsiones. La prueba de convulsiones consistió en la selección de grupos de 5 ratones, a los cuales se les administró por vía oral un pretratamiento de 100 µL del extracto de *A. ochroleuca* a dosis de 0.1, 1.0, y 10 mg/kg, como control negativo se usó solución salina y como positivo clonazepam (1.5 mg/kg i.p.). Después de 45 minutos se les administraron por vía intraperitoneal 100 µL de estricnina (2 mg/kg), se midió el tiempo en que el ratón presentaba la primera convulsión (tiempo de latencia), así mismo se registraron los tiempos de las convulsiones (duración de las convulsiones).

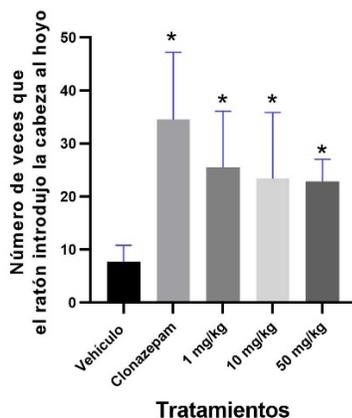
Análisis estadístico. Todos los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente en el software GraphPad Prism 9®. Se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguido de una prueba Tukey y un modelo Dunnett. Presentando una $\alpha=0.05$ y solo se consideraba diferencia significativa cuando $p < 0.05$ y se indica mediante un asterisco (*).

Resultados

Hole-Board Test

Los resultados muestran que con el extracto vegetal de *Argemone ochroleuca* incrementó ($p < 0.05$), de una manera no dependiente de la dosis, el número de veces en las que los ratones introdujeron sus cabezas en los hoyos, lo cual sugiere un efecto ansiolítico. El efecto ansiolítico obtenido en la dosis de 50 mg/kg del extracto es de menor actividad comparado al del clonazepam 1.5 mg/kg (Gráfica 1).

**Comparación del efecto ansiolítico:
 Número de veces que el ratón introdujo la cabeza al hoyo
 vs tratamientos**

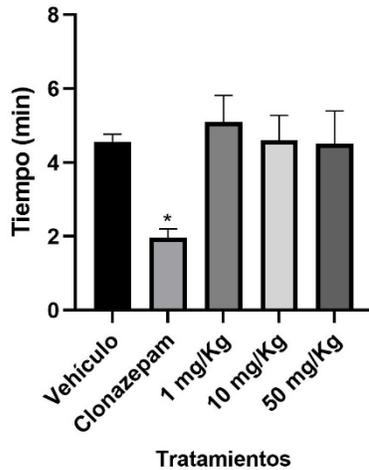


Gráfica 1. Resultados del Hole Board Test. Los resultados representan la media \pm error estándar. Los datos se analizaron con un análisis de ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett. * denota $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo

Efecto sedante

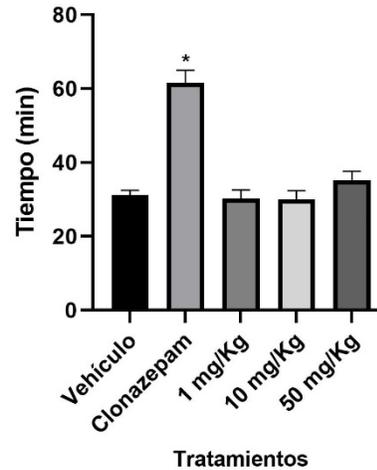
Los resultados mostraron que el extracto vegetal (1-50 mg/kg p.o.) no potencio los efectos hipnóticos del pentobarbital, lo cual sugiere que el extracto de *Argemone ochroleuca* carece de efectos sedantes. Por el contrario, el control positivo disminuyó ($p < 0.05$) el tiempo de latencia e incrementó ($p < 0.05$) la duración del sueño (Gráfica 2).

(a) Modelo Dunnett Fase 1



Grafica Dunnett (b) Dunnett Indica

(b) Modelo Dunnett Fase 2



2. (a) Modelo de la Fase 1. Modelo de la fase 2. * diferencia significativa

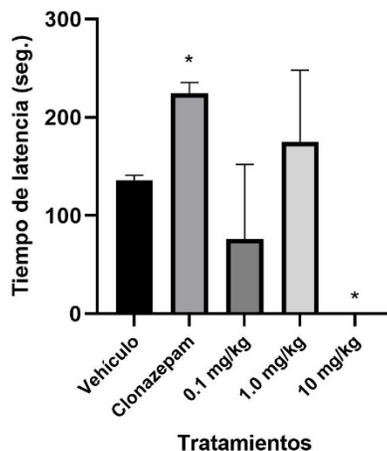
Convulsiones

Los resultados de convulsiones mostraron que la dosis de 10 mg/kg del extracto de *A. ochroleuca* es significativamente diferente ($p < 0.05$) del vehículo y el clonazepam 1.5 mg/kg, debido a que se encontró un efecto anticonvulsivo, cabe señalar que, esta misma dosis del extracto tiene mejor efecto anticonvulsivo que las dosis de 0.1 y 1.0 mg/kg del extracto.

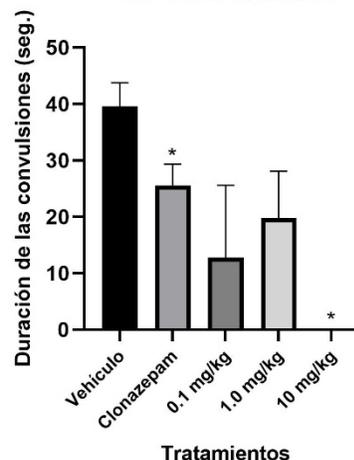
La dosis de 1.0 mg/kg del extracto de *A. ochroleuca* tiene efecto anticonvulsivo similar al clonazepam 1.5 mg/kg (gráfica 3).

El porcentaje de mortalidad lo muestra la gráfica 4, donde se identificó que la administración previa de las diferentes dosis del extracto de *A. ochroleuca* tiene mayor eficacia en la dosis de 1.0 g/kg (40%) respecto del control positivo (clonazepam 1.5 mg/kg). Sin embargo, se comprueba que el porcentaje de mortalidad para la dosis de 10 mg/kg es 0, ya que se encontró que no provoca convulsiones a esta dosis del extracto (gráfica 4).

(a) Comparación de los tiempos de latencia

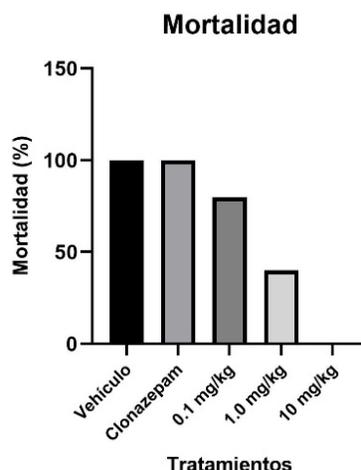


(b) Comparación de la duración de las convulsiones



Grafica 3. (a)

Modelo de Dunnett para los tiempos de latencia. (b) Modelo de Dunnett de la duración de las convulsiones.



Grafica 4. Porcentajes de mortalidad de los tratamientos para la prueba de convulsiones

Discusión

Hole-Board Test

El Hole-Board Test, es una prueba conductual útil para evaluar los fármacos con efectos ansiolíticos [9], fue introducida en 1962 por Boissier y Simon; con la hipótesis de que la exposición a un entorno desconocido le crea un conflicto por la novedad de la situación [10,13]. Esta prueba consiste en una caja con un número determinado de agujeros en donde el ratón puede introducir su cabeza hasta las orejas (head-dipping); se coloca al ratón en el centro de la caja y se evalúa el head-dipping por 5 minutos, al final se registra el número de veces que el ratón introdujo su cabeza por los orificios [13].

El estado de ansiedad junto con el número de introducciones de cabeza tiene una relación inversa, en la que la frecuencia de la inmersión de la cabeza indica una reducción de la ansiedad y viceversa [11,12,13]. Las benzodiacepinas, incrementan el número y la duración del head-dipping a los orificios [13], por lo que, con el clonazepam, los ratones tienen el mayor número de introducciones. Sin embargo, el extracto vegetal de *Argemone ochroleuca* tuvo un efecto menor, pero significativo para esta prueba, demostrando su efecto ansiolítico.

Efecto de sedante

A partir del análisis estadístico ANOVA se determinó que $Prob > F$ es mayor a $\alpha = 0.05$, lo cual afirma que no existen diferencias significativas entre los efectos de las diferentes concentraciones utilizadas.

En la prueba Dunnett se muestra que las medias de las distintas concentraciones son cercanas a las del vehículo permitiendo identificar que no hay efecto sedante aun siendo combinados con pentobarbital, pues los efectos ansiolíticos están por debajo del tiempo de sueño inducido con clonazepam indicando una diferencia significativa. Se debe tener en cuenta que las sustancias hipnóticas disminuyen la latencia para el inicio del sueño e incrementan el tiempo total de sueño [20].

Adicionalmente, no existe un efecto dependiente de la dosis aun cuando se incrementa la concentración, ya que el periodo de latencia y la duración del efecto siguen siendo similares entre sí.

Convulsiones

En el presente trabajo se analizó la actividad anticonvulsivante del extracto de *Argemone ochroleuca* en ratones de la cepa BALB/c sometidos al modelo de inducción de convulsiones con estriquina (2 mg/kg i.p.). Estudios preclínicos demuestran que las benzodiacepinas como el clonazepam, fármaco clínicamente

preinscrito como anticonvulsivo [14,15,16], aminoran la severidad de las convulsiones inducidas por estricnina [14,17,18].

Se observó la mejor eficacia con la dosis de 10 mg/kg del extracto de *A. ochroleuca*, debido a que experimentalmente se evidenció que tiene propiedades anticonvulsivas cuando se administra vía oral previamente a la administración de estricnina (2mg/kg i.p.), ya que, no se presenta un tiempo de latencia, a diferencia del clonazepam (1.5 mg/kg) que sí presenta latencia [15,16], un tiempo de convulsiones y un porcentaje de mortalidad de 100, en cambio, esta misma dosis del extracto demostró tener un porcentaje de mortalidad de 0, respecto al vehículo y las otras dosis del extracto (0.1 y 1.0 mg/kg).

Conclusión

Los hallazgos de este estudio demuestran por primera vez que el extracto de *Argemone ochroleuca* presentó efectos ansiolíticos sin inducción de efectos sedantes en ratones. También se encontró evidencia de que a una dosis de 10 mg/kg el extracto de *A. ochroleuca* tiene efecto anticonvulsivo.

Bibliografía/Referencias

- Reyes-Ticas, J. A. (s. f.). Concepto de ansiedad. En TRASTORNOS DE ANSIEDAD GUIA PRACTICA PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO (pp. 10–15).
- Ansell EB, Pinto A, Edelen MO, Markowitz JC, Sanislow CA, Yen S, Zandarini M, Skodol AE, Shea MT, Morey LC, Gunderson JG, McGlashan TH, Grilo CM. The association of personality disorders with the prospective 7-year course of anxiety disorders. *Psychol Med.* 2011 May;41(5):1019-28. doi: 10.1017/S0033291710001777
- Alonso-Castro, A. J., Ruiz-Padilla, A. J., Ortiz-Cortes, M., Carranza, E., Ramírez-Morales, M. A., Escutia-Gutiérrez, R., Ruiz-Noa, Y., & Zapata-Morales, J. R. (2021). Self-treatment and adverse reactions with herbal products for treating symptoms associated with anxiety and depression in adults from the central-western region of Mexico during the Covid-19 pandemic. *Journal of Ethnopharmacology*, 272.
- Reyes, F. D., Peña, C. J., Canales, M., Jiménez, M., Meráz, S., & Hernández, T. (2011). Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(2), 139–146. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85617384007.pdf>
- Rosas-Becerril, M.J.; 2018, Perfil de alcaloides por HPTLC y GC-EIMS de dos especies del género *Argemone*, CINVESTAV
- Hernández-Martínez, A. L., Cervantes-Jauregui, J. A., Cruz-Cruz, D., & Villegas-Gómez, C. (2020). "Chicalote" *Argemone ochroleuca* Sweet: La Gran Fábrica de Alcaloides. *Naturaleza y Tecnología*, 16–23.
- Hernández-Ruiz, J., Bernal, J., Ruiz-Nieto, J., Gonzales-Castañeda, J., & Mireles-Arriaga, A. (2020). *Argemone ochroleuca*: (PAPAVERACEAE), ALKALOID POTENTIAL SOURCE FOR AGRICULTURAL AND MEDICINAL USES. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2). <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2844/1408>
- Martínez-Delgado, A. A., de Anda, J., León-Morales, J. M., Mateos-Díaz, J. C., Gutiérrez-Mora, A., & Castañeda-Nava, J. J. (2021). *Argemone* species: Potential source of biofuel and high-value biological active compounds. *Environmental Engineering Research*, 27(2). Recuperado 19 de julio de 2022, de <https://doi.org/10.4491/eer.2020.619>
- Ohi, F. (2003). Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 3(4-5), 233–238. doi:10.1016/s1566-2772(03)00084-7
- Hiroshi Takeda, Minoru Tsuji, Teruhiko Matsumiya. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, 350(1998).
- Brown GR, Nemes C. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia? *Behav Processes.* 2008 Jul;78(3):442-8. doi: 10.1016/j.beproc.2008.02.019.
- Casarrubea, M.; Di Giovanni, G.; Crescimanno, G. Effects of Different Anxiety Levels on the Behavioral Patternings Investigated through T-pattern Analysis in Wistar Rats Tested in the Hole Board Apparatus. *Brain Sci.* 2021, 11, 714. <https://doi.org/10.3390/brainsci11060714>

- REJÓN-ORANTES, JOSÉ DEL CARMEN; PLACER PERDOMO, DIANA; ROLDÁN, GABRIEL. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas Médica*, 52(1). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231019866006>
- Ngo E, Nghab E, Ekoundic C, Dongc C, Ayissi R, Rakotonirinac S. (2004). Sedative and anticonvulsant properties of *Passiflora edulis* dried leaves decoction in mice. *Afr. J. Trad. CAM.* 1(1): 63-71.
- Alpizar, C. C. (2020). Prescripciones de benzodicepinas y barbitúricos en Costa Rica 2011–2015. *SciELO*. versión On-line ISSN 2007–7459 versión impresa ISSN 1665–3262. Recuperado en julio de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-74592020000200277
- Fernández-Chalco, J., Jaimes-Paredes, H., Zegarra-Mayhuire, A., & Quevedo-Valverde, O. H. (2018). Efecto diurético de la pulpa del fruto de la *Passiflora edulis* (maracuyá) en *Rattus rattus* var *albinus*. UNIVERSIDAD INTERAMERICANA PARA EL DESARROLLO DE PERÚ. Recuperado en julio 2022, de <http://repositorio.unid.edu.pe/bitstream/handle/unid/30/8%20Pasiflora%20edulis%20-%20Efecto%20diuretico.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Gómez- Contreras, K. E. (2019). EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE *Passiflora edulis* EN RATONES (ALBINOS SWISS) HIPERTENSOS. UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCANELICA. Recuperado en julio 2022, de <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2931/TESIS-2019-OBSTETRICIA-G%c3%93MEZ%20CONTRERAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mora-Pérez, A., & Hernández-Mendel, M. R. (2016). Anticonvulsant activity of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* Lam. stems and roots in mice: A comparison to diazepam. Elsevier. Recuperado julio de 2022, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485315001590?via%3Dihub>
- Rejon-Orantes J, Placer D, Rolan G (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*. 52(1):78-89.
- arlini EA, Contar J de DP, Silva Filho AR, Da Silveira Filho NG,
- Chávez, Mervin, Nava, Manuel, Palmar, Jim, Martínez, María Sofía, Graterol Rivas, Modesto, Contreras, Julio, Hernández, Juan Diego, & Bermúdez, Valmore. (2017). En búsqueda del hipnótico ideal: tratamiento farmacológico del insomnio. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36(1), 10-21. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642017000100002&lng=es&tlng=es.
- File SE, Pellos S. 1985. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the hole board. *Brit J Pharmacol.* 86(3):729-735.