

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DEL EXTRACTO DE *Schizanthus grahamii*
SOBRE LA CONDUCTA EN RATAS, SOMETIDAS A PRUEBAS DE
COMPORTAMIENTO**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

HERBERT RODOLFO JANS LUNA

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE : Dr. Frédérick Ahumada M.

Nombre

Firma

PROFESOR COPATROCINANTE: Dra. Viviana Bustos S.

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR: Dr. Orlando Muñoz M.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES: Dr. Marcos Moreira E.

Nombre

Firma

Dr. Hernán Aguilar E.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

28 de Diciembre de 2005

A mis padres, que me iluminan con todo su amor.

ÍNDICE.

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43
8. ANEXOS.....	48
9. AGRADECIMIENTOS.....	54

1. RESUMEN

Se evaluó el efecto, sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) en ratas, de los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii*, mediante la realización de las pruebas de observación en Caja Porta-Rata, prueba de Campo Abierto con Agujeros, prueba de Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico y Tiempo de Sueño Inducido por Pentobarbital Sódico.

Se utilizaron 30 ratas machos Sprague-Dawley, con un peso aproximado entre 190 y 240 gramos, distribuidas al azar en 2 grupos de 15 animales cada uno. La distribución de los grupos fue la siguiente: 1) Control negativo con agua destilada. Se administra 0,5 ml/100g rata; 2) Dosis de *Schizanthus grahamii* (10mg/kg). En una solución de 2 mg/ml de la que se administra 0,5 ml/100g rata.

Las ratas se sometieron a un ayuno de 24 horas, con agua ad libitum, previo al inicio del experimento. Las soluciones se administraron por vía intraperitoneal, 20 minutos antes del inicio de las pruebas. Las ratas fueron sometidas a 4 modelos experimentales en forma individual.

1. Caja Porta-Rata (5 minutos): para la observación de las variables cualitativas de estudio, conformadas por lagrimación, salivación, piloerección, nivel de actividad, reacción al ruido y al pinzar la cola, manipulación al retirar la rata, tono muscular, respuesta pupilar y acciones repetitivas.

2. Tablero de Campo Abierto con Agujeros (10 minutos) se controló el número de cuadrados avanzados, posiciones bípedas, intromisiones en agujeros, crotines y el número y duración de los aseos.

3. Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (5 minutos): se registraron las variables estipuladas en la pauta de observación programada.

4. Tiempo de Sueño Inducido: se administró pentobarbital sódico en dosis de 15 mg/kg, por vía intraperitoneal, registrándose el tiempo para cada variable en medición.

De acuerdo a los resultados obtenidos en Caja Porta-Rata en las variables: nivel de actividad y tono muscular se presentaron niveles aumentados para el grupo Schizanthus en relación al grupo control; en Tablero de campo Abierto con Agujeros, las variables: número de cuadrados avanzados, número de posiciones bípedas y número de crotines presentaron niveles mayores en el grupo Schizanthus; en Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico la variable: head dipping presentó diferencias estadísticamente significativas siendo mayor en grupo Schizanthus; en la prueba de Tiempo de Sueño inducido por Pentobarbital Sódico, en las variables: período de latencia para hipnosis con mayor tiempo de latencia para el grupo Schizanthus y duración de depresión total con duración de tiempo menor para el grupo Schizanthus, con diferencias significativas. Es posible concluir que los alcaloides provenientes de *Schizanthus grahamii* producen signos de excitación en el SNC de las ratas.

Palabras claves: *Schizanthus grahamii*, ratas, pruebas de comportamiento, tiempo de sueño inducido, pentobarbital sódico.

2. SUMMARY

“EFFECT OF TROPANE TYPE ALKALOIDS FROM *Schizanthus grahamii* ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN RATS”

In the present study, the effect of tropane type alkaloids from *Schizanthus grahamii* on the Central Nervous System (CNS) of rats was studied, by testing in a keeping-rats box test, Open field test with hole, Elevated Asymmetric Plus Maze and Induced Sleeping Time by Pentobarbital Sodium.

30 Sprague – Dawley male rats weighting 190 to 240 g were used and distributed at random in two groups of fifteen animals each. The distribution was as follows: 1) Distilled water (0,5 ml/100 rat). 2) Dose of *Schizanthus grahamii* (10 mg/kg). Solution of 2 mg/ml in dose of 0,5 ml/100g rata

The rats were maintained in fasting for 24 hours, with water ad libitum, previous to the beginning of experiment. The rats were submitted to experimental model individually were after 20 minutes of latency.

1. Keeping-Rats Box (5 minutes): in order to observe qualitative variables, like shedding tears, salivation, piloerection, activity level, noise and tail compression reaction, holding out the rats, muscular tone, pupillary response and repetitive action.

2. Open Field with Holes (10 minutes) to observe the number of: squares crossings, n rearing, faecal boli and the number an duration of grooming.

3. Elevated Asymmetric Plus Maze (5 minutes): the variables in the programmed guide of observation were recorded.

4. Induced Sleeping Time test: pentobarbital sodium was given in dose of 15 mg/kg, by intraperitoneal injection, where time for each variable measured were recorded.

According to the results obtained in the Keeping-Rats box, the variables: activity level and muscular tone, higher levels were found for the Schizanthus group in comparison to the control group; in Open Field Test with Hole, the variables: number of squares crossings, number of rearing and , number of faecal boli, also show higher levels for the Schizanthus group; in Elevated Asymmetric Plus Maze the variable: head dipping show a statistically significant difference between the schizanthus group in comparison to the control group; the Induced Sleeping Time Test, the variables: time of hypnosis and total depression, show a statistically significant difference between the Schizanthus group in comparison to the control group. It is possible to conclude that the alkaloids of *Schizanthus grahamii* produce signs of CNS excitation.

Keywords: *Schizanthus grahamii*, rats, behavior proves, Induced Sleeping Time, pentobarbital sodium.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. FITOTERAPIA.

La “Fitoterapia” es un término procedente del griego (Phytos: planta y Terapia: tratamiento), que corresponde a la ciencia del tratamiento de las enfermedades por medio de las plantas o sustancias vegetales (Montes y Wilkomirsky, 1985; Briones, 1990).

El hombre primitivo obtuvo de las plantas los medios para su alimentación, abrigo, salud y bienestar general. Así, los primeros medicamentos tuvieron su origen en las plantas, muchas de las cuales por sus propiedades curativas están actualmente en uso (Montes y col., 1992). Desde la antigüedad, las culturas más disímiles coincidieron en reconocer la utilidad del uso de hierbas y plantas para el tratamiento de enfermedades (Magalhaes, 1999).

Se tiene conocimiento de que los primeros en detallar los usos de las hierbas y plantas fueron los chinos entre los años 2500 y 3000 antes de Cristo, al igual que los egipcios que hacia el año 2500 a.C. contaban con médicos herbolarios que trataban a sus pacientes en base a plantas medicinales e incluso tóxicas. Luego le siguieron los hindúes y los griegos, estos últimos fueron los primeros en sistematizar el conocimiento de las plantas a través de libros sobre hierbas, que luego se conocieron en occidente (Hoffman y col., 1992). La influencia más permanente de la fitoterapia, hasta nuestros días, procede de la clásica obra “Materia Médica de Dioscórides” (Siglo I d.C.), en la que describió más de 600 plantas medicinales (Montes y col, 1992).

En América, los Mayas, Aztecas, Incas y Aymaras, lograron un alto grado de conocimiento en botánica médica. En Chile, las plantas medicinales de uso más corriente reconocen como fuente de origen, especies nativas usadas por lo mapuches y especies introducidas por los europeos. Los cronistas españoles reportaron que los mapuches conocían y manejaban cerca de 200 especies de hierbas con propiedades terapéuticas (Farga y col., 1988). Su uso se ha llevado a cabo por recomendación popular, basado en las valiosas experiencias recogidas y transmitidas de generación en generación (Montes y Wilkomirsky , 1985; Farga y col., 1988).

Durante el siglo XIX el uso de las plantas medicinales fue perdiendo adeptos, restringiéndose su práctica a los lugares apartados debido a que los medicamentos se fueron obteniendo cada vez más por medio de procesos químicos industriales (Hoffman y col., 1992).

Este desarrollo de la química estableció las bases para la caracterización detallada y estudio experimental de los principios activos farmacológicos derivados de fuentes naturales, posteriormente se produjo un rápido desarrollo en el aislamiento de principios activos de una gran variedad de plantas medicinales (Booth y McDonald, 1988). En Chile, el uso de las

plantas medicinales disminuyó considerablemente, a fines de los años 40, desde que comenzó la elaboración industrial de medicamentos (Medina, 1998).

Al pasar el tiempo, se hizo evidente que los productos sintéticos, a pesar de ser muy efectivos para atacar las enfermedades, pueden provocar efectos secundarios no deseados. Tal hecho derivó en un control más estricto de los medicamentos. Sin embargo, aumentó el temor a los fármacos sintéticos y comenzó un movimiento popular encaminado a volver a lo natural (Hoffman y col., 1992).

En los países en vías de desarrollo, la falta de poder adquisitivo llevó a que la mayor parte de la población no tuviera acceso a los medicamentos industrializados, permitiendo de tal manera, que las plantas medicinales adquieran cada vez mayor importancia (Hoffman y col, 1992; Sharapin, 2000). Dentro de esta tendencia, la medicina tradicional fue reconocida en los años 70 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo que confirió un poderoso impulso a la investigación de las plantas medicinales (Magalhaes, 1999).

Actualmente, en varios países, el empleo de plantas medicinales es importante en los cuidados básicos de la población, siendo utilizados por grandes masas en el tratamiento de las enfermedades a pesar de los avances en la medicina y farmacia moderna (Guerra y Sánchez, 1984; RIVAPLAMED, 1996; Medina, 1998). La Organización Mundial de la Salud está estimulando a los países a identificar y aprovechar los aspectos de la medicina tradicional. Es así, como a través de la resolución WHA 31.33, reconoció la importancia de las plantas medicinales y recomendó que sean establecidos “criterios científicos y métodos para asegurar la calidad de las preparaciones obtenidas con plantas medicinales y su efectividad en el tratamiento de condiciones y enfermedades específicas; patrones internacionales y especificaciones de identidad, pureza, potencia y buenas prácticas de fabricación, métodos para el uso seguro y eficaz de productos fitoterapéuticos por diferentes profesionales del área de la salud y establecimiento de centros de investigación y capacitación para el estudio de plantas medicinales” (Sharapin, 2000). De esta manera surge el concepto de “validación” de las plantas medicinales, que se refiere a la serie de conocimientos y pruebas experimentales, que puedan permitir tener la razonable garantía sobre la seguridad y la eficacia en su proyección terapéutica al ser humano (Villar, 1996).

Según Villar (1996), para aceptar que las plantas puedan ser utilizadas como medicamento se debe considerar que otorguen la garantía de:

- Seguridad, mediante el conocimiento de su uso y no toxicidad ancestral, la ausencia de toxicidad mediante referencias bibliográficas y pruebas toxicológicas experimentales sencillas.
- Eficacia, mediante el conocimiento tradicional y bibliográfico de su aplicación terapéutica, y ensayos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* que validen su uso terapéutico.
- Calidad, mediante el conocimiento de sus principios activos cuali- y cuantitativamente, o a falta de ellos, de sustancias marcadoras de calidad.
- Y además, considera realizar ensayos farmacológicos clínicos como garantía de una farmacovigilancia efectiva.

Se reconoce que las propiedades medicinales de las plantas, reside en la presencia de principios activos que tienen la capacidad de producir transformaciones fisiológicas para sanar algunos males o enfermedades (CETAL, 1993).

Los principios activos son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento (Briones, 1990). Son producidos y almacenados en diversas partes de la planta y se encuentran unidos a otros constituyentes formando el fitocomplejo activo, del cual se liberan gradualmente en el organismo. La mayoría de los principios activos pueden clasificarse en 2 grandes grupos: alcaloides y flavonoides, uno u otro son componente mayoritarios en las plantas y de una u otra manera determinan su acción (Montes y col, 1992; Hoffman y col., 1992).

3.2. *Schizanthus grahamii*.

Las plantas del género *Schizanthus*, pertenecientes a la familia *Solanaceae*, concentran una variada gama de bases de tipo esqueleto tropano (Muñoz, 1992). Este género incluye a doce especies originarias de Chile, con la excepción de *Schizanthus grahamii* cuya área de dispersión alcanza también a Argentina.

Es conocido más bien por sus características ornamentales que por sus propiedades químicas o su potencial aplicabilidad medicinal. Durante mucho tiempo la botánica clásica lo clasificó como un género monotípico de Chile, representante de la Familia *Scrophulariaceae* (Hunziker, 1979). Esta aseveración se mantuvo largo tiempo como un hecho establecido en los textos botánicos, ya que *Schizanthus* posee flores zigomorfas, característica no común de la familia *Solanaceae*, avalado por otra serie de características morfológicas, serológicas, inflorescencias, etc. (Grau, 1992). Sin embargo las evidencias de tipo químico (San Martín y col., 1980, Gambaro y col., 1983) descartaron tal posibilidad al demostrar que el género *Schizanthus* concentra una gran variedad de alcaloides del tipo tropano, situación absolutamente ausente en la Familia *Scrophulariaceae*.

Informes no confirmados señalan que algunas especies de este género son empleadas en la cordillera andina de Chile central por arrieros y montañistas, quienes le atribuyen propiedades estimulantes, sin embargo, ello no ha sido demostrado (Foto 1 y 2).

Los estudios químicos del género *Schizanthus* en Chile comenzaron con las investigaciones de Castillo y colaboradores a partir de los años 80 (Gambaro y col., 1983). Se pudo inferir que el género acumula un amplio espectro de alcaloides derivados del tropano con estructuras únicas (De la Fuente y col., 1988), con formación de mono y diésteres derivados principalmente de los ácidos angélico, tíglico, senecioico, itacónico y/o mesacónico; así como la síntesis de derivados de higrina e higrolina (Gambaro y col., 1983).

No se conocen antecedentes etnobotánicos en relación a las posibles propiedades medicinales de algunas de las especies de *Schizanthus*. Algunas de las especies del género

Schizanthus suelen ser conocidas por una serie de sinonimias comunes: “orquídea del hombre pobre”, “flor de pajarito”, “pajarito”, etc.



FOTO 1: Flores de *Schizanthus grahamii*¹



FOTO 2: *Schizanthus grahamii*²

Algunos alcaloides aislados del género *Schizanthus* podrían tener cierta afinidad inhibitoria con los receptores colinérgicos muscarínicos por su similitud con la estructura 8-azabicyclo [3.2.1]-octano, esqueleto químico básico de la atropina. Las estructuras que tienen un amonio cuaternario, como el sulfato de ésta, incrementan su captación por receptores colinérgicos nicotínicos y pueden bloquearlos a concentraciones similares a las que producen bloqueo muscarínico (Hardman y col. 2003; Katzung, 1999).

Trabajos en *Schizanthus grahamii* han permitido el aislamiento de una serie de bases diméricas de tropano: schizantina C 35, D 37 y E 38, además del monoéster 3 α -senecioiloxitropano 36 (San Martín y col., 1980). Otros alcaloides con esqueleto tipo tropano presentes en esta especie son: higrina; higrina A; higrina B; tropinona; tropina; pseudotropina; 3 α -acetoxitropano; 3 α , 7 β -dihidroxitropano; 5-(2-oxopropil)-higrina; 5-(2-hidroxi)-higrina; cuscohigrina; 3 α senecioiloxi-7 β -hidroxitropano y shizantina F, G, H e I (Muñoz, 1992).

¹ Fotografía 1 disponible en : http://www.thompson-morgan.com/seeds/us/product_7429_1.html

² Fotografía 2 disponible en : http://www.thompson-morgan.com/seeds/us/product_7429_1.html

3.3. Propiedades farmacológicas de los Alcaloides tipo tropano.

Desde el punto de vista estructural, los alcaloides del tropano están divididos en dos grupos:

1. Aislados de la familia *Eritroxilacea*. Principalmente del género *Erythroxylon*, únicas especies que concentran cocaína. Un grupo importante de estas bases difieren de los alcaloides del tropano por la presencia de un carbono más, que se inserta en el C2 del anillo tropánico como carboxilo libre o carboxilato y cuya función alcohólica en C3 se orienta al anillo tropano; casi todos son ésteres de ecgonina con configuración 3 β (Brachet y col., 1997).
2. Aislados de la familia *Solanaceae*. Se incluyen en esta categoría a las especies del género *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Mandrágora*, *Escopolia* y otros. Los compuestos se caracterizan por la presencia de la molécula del sistema básico azabicyclo [3.2.1]-octano o notropano. Su N-metil derivado de llama tropano y los miembros oxigenados más simples son el tropanol y su derivado oxidado tropanona. En atropina y escopolamina el ácido esterificante es el ácido trópico, compuesto solo encontrado en esta familia de plantas. La presencia de alcaloides de tropano también se ha descrito en otras familias de plantas: *Proteaceae*, *Cruciferae*, *Convulvolaceae*, *Euphorbiaceae* y *Rhizophoraceae*, aunque en estas familias la naturaleza estructural de muchos de estos alcaloides de tropano es significativamente diferente de las dos familias antes mencionadas (Griffin y Lin, 1999).

Las plantas que contienen alcaloides de tipo tropano, que tienen características similares a la atropina y derivados y por lo tanto poseen un efecto bloqueador colinérgico; de ahí que las investigaciones farmacológicas estén dirigidas al tratamiento de intoxicaciones por organofosforados, en la farmacoterapia de afecciones oculares por su efecto midriático, como inhibidores de la secreción de HCl, estados broncoconstrictivos de predominio vagal, reductoras de la espasticidad del músculo liso intestinal, en la disminución riesgosa de la frecuencia cardíaca, mareos, vómitos y últimamente para minimizar los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

También existen estructuras que además de tener afinidad por receptores colinérgicos muscarínicos pueden bloquear a otros, tales como histamínicos, dopaminérgicos o serotoninínicos. Los receptores colinérgicos muscarínicos presentan diferente sensibilidad a la acción bloqueadora de un inhibidor: si se toma como prototipo a la atropina, ésta muestra similar afinidad por los diferentes subtipos de receptores muscarínicos de proyección clínica denominados M₁, M₂ y M₃, este es uno de los motivos de su amplio espectro de efectos y por lo tanto escasa selectividad lo que explica la mayor ocurrencia de reacciones adversas.

Otra interpretación de sus efectos está relacionada a la estructura molecular de los bloqueadores colinérgicos, éstos al ser terciarios (de base libre) son de fácil absorción intestinal, atraviesan la barrera hematoencefálica, lo que explica el uso clínico orientado al

tratamiento de estados de aumento del tono de fibra muscular lisa e inclusive en el mal de Parkinson.

Las moléculas de estructura cuaternaria son de más lenta absorción en el sistema digestivo, su distribución es menor y no cruzan la barrera hematoencefálica, por lo que son usadas de preferencia en afecciones gastroentéricas. A su vez, los receptores ubicados en distintos órganos muestran diferentes grados de sensibilidad ante los bloqueadores; el orden decreciente de sensibilidad es: glándulas salivales, bronquiales y sudoríparas, músculo liso vascular y sistema excito-conductor del corazón, tubo digestivo, urinario, glándulas de secreción gástrica y receptores muscarínicos de los ganglios vegetativos.

De lo anterior se puede deducir que los efectos de estas estructuras pueden variar en su selectividad y conjuntamente con la manifestación de la acción terapéutica deseada, se presenten concomitantemente efectos adversos (Muñoz, 1992; Florez, 1997; Katzung, 1999; Hardman y col., 2003). Esto incentiva a investigar la química y farmacología de los alcaloides presentes en *Schizanthus* como una eventual fuente de novedosas estructuras con potencial acción selectiva.

Uno de los efectos estudiados sobre el SNC es el relacionado con distintos grados de depresión o de excitación a distintas dosis y bajo ciertas situaciones, donde bloqueadores colinérgicos conocidos fueron empleados.

A dosis terapéuticas (0.5 a 1.0 mg), la atropina produce solo excitación vagal leve, como resultado de estimulación del bulbo raquídeo y de los centros cerebrales superiores. Con dosis tóxicas de atropina, se vuelve más notable la excitación central, y esto da por resultado inquietud, irritabilidad, desorientación, alucinaciones o delirio. Con dosis aun mayores, la estimulación va seguida de depresión, que culmina en colapso circulatorio e insuficiencia respiratoria después de un periodo de parálisis y coma.

A dosis terapéuticas, la escopolamina genera, en condiciones normales depresión del SNC que se manifiesta por somnolencia, amnesia, fatiga e incapacidad de ensoñación, con reducción de la etapa de sueño de movimientos oculares rápidos. También produce euforia y, por tanto, es motivo de cierto abuso. Antes se buscaban los efectos depresivos y amnésicos cuando se administraba escopolamina como auxiliar de los agentes anestésicos o en la medicación preanestésica. Sin embargo, en presencia de dolor intenso las mismas dosis de escopolamina originan a veces excitación, inquietud, alucinaciones o delirio. Estos efectos excitadores, que semejan a los de las dosis tóxicas de atropina, se producen con regularidad después de administrar grandes dosis de escopolamina (Hardman y col, 2003).

3.4. MODELOS EXPERIMENTALES.

Las pruebas que se realizaron para evaluar el extracto de *Schizanthus grahamii* fueron:

- 1.- Observación en Caja Porta – Rata.
- 2.- Campo Abierto con Agujeros.
- 3.- Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico.
- 4.- Tiempo de Sueño Inducido por Pentobarbital Sódico.

1.- La observación en la Caja Porta - Rata representa una versión modificada de la batería de observación funcional (F.O.B) que es preconizado y recomendado por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (E.P.A) para la detección y regularización de fármacos con posible acción depresora. F.O.B, consiste básicamente en procedimientos no invasivos diseñados para detectar y estudiar la totalidad de las deficiencias funcionales y a la vez cuantificar mejor los efectos neurológicos y/o conducta animal anormal, provocadas por residuos o fármacos con acción neurotóxica mostrando una completa descripción de la apariencia, conducta e integridad funcional del animal en estudio, es utilizada en combinación con otras pruebas entre ellas Campo Abierto, con el propósito de obtener mayor información relacionada con la investigación neuroconductual en animales.

2.- El Tablero de Campo Abierto se ha utilizado originalmente como instrumento que permite estudiar la emocionalidad, sirviendo como base para las otras pruebas que registran conductas particulares de los animales como: número de cuadrados avanzados, posiciones bípedas, intromisión en los agujeros, número y duración de aseos dentro del tablero. Una de las razones de su uso es la comodidad que brinda para colocar animales de varios tamaños en un ambiente en el cual no han tenido experiencia previa, distinto al sitio en que se encuentran habitualmente, de mayores dimensiones y luminosidad, lo cual origina una respuesta por parte del animal. Esta prueba mide la actividad motora, de exploración y defecación, permitiendo inferir el estado emocional del animal, como la curiosidad del animal lo cual interfiere en mayor o menor grado de depresión o excitación del SNC (RIVAPLAMED, 1996).

3.- La prueba de Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico permite realizar estudios de comportamiento, valorando la acción depresora del sistema nervioso central de algunos animales sometidos a tratamientos con ciertas sustancias (RIVAPLAMED, 1998).

En el Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico el factor geométrico sería capaz de inducir una reacción de incentivo exploratorio y por otro lado una reacción adversa o de temor. En este modelo se considera que la exploración activa del animal en cada brazo es un índice aproximado de los procesos motivacionales que ocurren en el cerebro. Como índice de la emoción o miedo, se toma en cuenta la propiedad etológica que los animales muestran en un determinado grupo de conductas no exploratorias cuando están en un sitio donde se sienten seguros y por lo tanto no tienen miedo (Alvarez y col., 1999). El hecho que los animales muestren menos preferencias por los brazos abiertos parece descansar además en la

imposibilidad de efectuar tigmotaxis, es decir, avanzar o permanecer al lado de superficies verticales (Treit y col., 1993)

Esta prueba conductual posee los tres tipos de validez necesarios para que un modelo animal logre su cometido satisfactoriamente. En primer lugar, tiene validez predictiva, ya que la administración de ansiolíticos no sólo incrementa la probabilidad de que el animal se aventure a explorar los brazos abiertos del laberinto, sino que además contribuye a que éste permanezca en ellos por un tiempo mayor. En segundo lugar, presenta una importante validez analógica, ya que la aversión para explorar espacios abiertos mostrada por los animales aislados es similar a algunos tipos de trastornos de ansiedad. Finalmente, también goza de validez teórica, puesto que el sustrato biológico que media los estados de ansiedad es similar para todos los mamíferos, tanto a nivel de sistemas córtico-subcorticales como neuroendocrinos (Pascual y col., 2003)

Además, su validez se sustenta en que sólo los fármacos ansiolíticos mejoran la frecuencia de ingresos y tiempo de permanencia en los brazos abiertos, en tanto que no se producen cambios conductuales significativos al administrar otros psicofármacos, como por ejemplo, antidepresivos y neurolépticos (Pascual y col., 2003).

Otro parámetro a evaluar en el Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico es el head dipping, el cual es un patrón de comportamiento, emitido en plataformas abiertas elevadas y caracterizado por una investigación visual hacia abajo, se puede considerar una manifestación del gravamen de riesgo relacionada con la ansiedad o con una conducta exploratoria (Hoshino y col., 2004)

Head dipping es asociado a los comportamientos repetitivos de los desordenes de ansiedad. Los lugares abiertos elevados son considerados ansiogénicos y/o aversivos a las ratas y sugiere que el caminar hacia abajo es la respuesta de escape a tal situación. El caminar generalmente precedido de head dipping es relacionado con la evaluación de la profundidad. Esta idea es apoyada por el realce de la emisión de head dipping cuando la distancia vertical es aumentada. En tal situación, la rata percibe el riesgo de una potencial caída peligrosa y repite el head dipping para mejorar el chequeo de la profundidad y para encontrar una manera segura de escaparse.

Otra explicación puede ser que el comportamiento head dipping no es lineal con el aumento del nivel de la ansiedad. Los aumentos en head dipping pueden resultar de la curiosidad exploratoria, que requiere bajos niveles de ansiedad. Es paradójico, ya que resultados iguales pueden ocurrir cuando el animal tiene altos niveles de ansiedad y busca un escape a condiciones aversivas y/o cuando predominan niveles bajos de ansiedad, donde head dipping y la permanencia en los brazos abiertos del laberinto pueden aumentar (Hoshino y col., 2004)

Las ventajas de este modelo etológico de estudio, además del costo y facilidad de implementación, son el empleo de estímulos de tipo natural y no requieren de entrenamiento de los animales (Dawson y Tricklebank, 1985; RIVAPLAMED, 1998).

Dentro de las desventajas, se encuentra la posibilidad de confundir los efectos ansiolíticos y ansiogénicos por cambios de la actividad motora (Ruarte y col., 1997). No permite investigar la administración crónica de un fármaco, debido al hábito exploratorio que desarrolla en los animales, lo que no hace posible su reutilización (Dawson y Tricklebank, 1985).

4.- La prueba de Tiempo de Sueño Inducido requiere el uso de un fármaco, elegido en este caso, del grupo de los barbitúricos. Uno de los barbitúricos de uso más frecuente en la elaboración de esta prueba biológica, es Pentobarbital Sódico. La administración paralela de la sustancia con acción sobre el sistema nervioso central, potenciará o disminuirá la hipnosis o narcosis inducida por él mismo (Guillemain y Tetau, 1980).

El Pentobarbital Sódico se utiliza en dosis hipnótica (15 mg/Kg), la cual es menor que la utilizada para inducir anestesia en ratas (30 – 40 mg/Kg) (Muir y col., 2001).

3.5. HIPOTESIS.

Los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* tienen un efecto excitatorio del SNC de rata en la vía y dosis administradas.

3.6. OBJETIVO.

Determinar el efecto del extracto de *Schizanthus grahamii* sobre el SNC de la rata, mediante el uso de pruebas de comportamiento y Tiempo de Sueño Inducido.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL.

4.1.1. Material Biológico:

Se utilizaron 30 ratas, machos, cepa Sprague-Dawley, con un peso aproximado entre 190 y 240 gr., procedentes del Bioterio de Animales de Experimentación del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile.

4.1.2. Material Farmacológico:

- Pentobarbital sódico (solución al 0,15%, en dosis de 15 mg/kg)
- Alcaloides de *Schizanthus grahamii**
- Solución de agua destilada.

4.1.3. Material de laboratorio:

- Balanza electrónica, con un margen de error equivalente a +/- 0,1 g.
- Lápices de tinta indeleble.
- Jaulas colectivas.
- Jeringas rotuladas de 3 ml.
- Agua destilada
- Cronómetros.
- Cámara de video.
- Guantes de goma anticorte.
- Pinza anatómica.
- Linterna oftálmica.
- Alcohol etílico absoluto 96%.
- Agujas 26G½.
- Toalla de papel absorbente.

4.1.4. Material de experimentación:

- Caja Porta - Rata (foto 3): es una caja de plástico con tapa de alambre y dos manillas de 29 cm. de ancho, de 36 cm. de largo y 20 cm. de alto, donde las ratas se mantuvieron durante los períodos de latencia y prueba de Observación Caja Porta - Rata.

* Alcaloides tipo tropano extraídos de plantas de *Schizanthus grahamii* (extracto de la fracción polar de *Schizanthus grahamii*) proporcionados por el Dr. Orlando Muñoz, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Foto 3: Caja Porta-Rata



- Tablero de Campo Abierto con Agujeros (Foto 4): tablero de madera de 1m² recubierto de acrílico color blanco, ubicado a 1 m de altura del suelo. Subdividido en 25 cuadrados de 20 x 20 cm., el cuadrado central presenta en cada vértice 1 orificio de 4 cm. de diámetro. El perímetro muestra cuatro paredes de 50 cm. de alto, revestidas en su cara interna con acrílico blanco. Se ilumina con un ampolleta blanca de 100 W dispuesta sobre el cuadrado central del tablero a 65 cm. de alto.

Foto 4: Tablero de campo abierto con agujeros.



- Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (Figura 1): es una estructura de madera ubicada a 80 cm. del suelo, consta de cuatro brazos formando una cruz, con una superficie lavable de color negro. Los brazos miden 40 cm. de largo y 10 cm. de ancho, y la plataforma central es un cuadrado de 20 cm. de lado. Las características de cada brazo son las siguientes:

Plataforma central (20 x 20 cm.)

Zona 1: Brazo abierto.

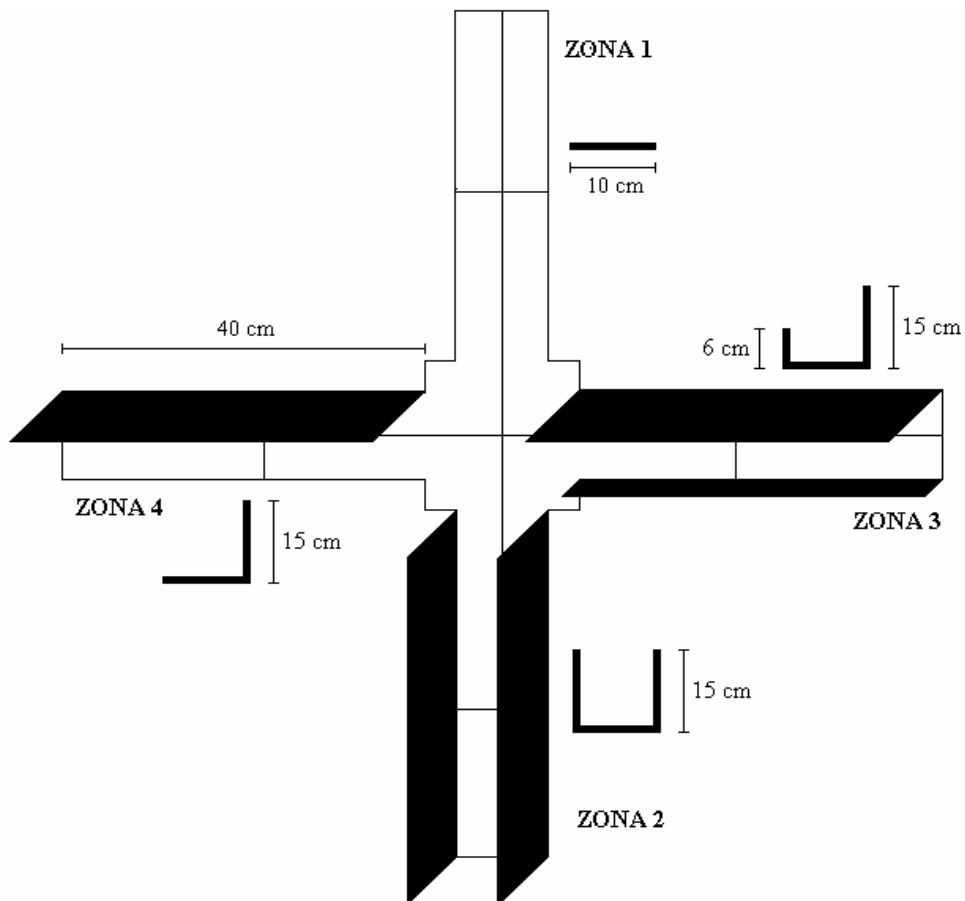
Zona 2: Brazo cerrado de dos paredes simétricas (15 cm. de altura).

Zona 3: Brazo cerrado de dos paredes asimétricas (15 y 6 cm. de altura)

Zona 4: Brazo con una pared (15 cm. de altura).

La iluminación del laberinto en cruz elevado asimétrico, se realizó con una lámpara fluorescente de 30 W (Ruarte y col. 1997)

Figura 1: Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico



- Mesa metálica: es una mesa de 40 cm. de ancho, 109 cm. de largo y 67 cm. de alto, la que fue cerrada con paredes de cartón de 25 cm. de alto. Se utilizó para la administración de las soluciones farmacológicas y para la observación del animal durante la prueba de Tiempo de Sueño Inducido.

4.1.5 Condiciones de trabajo: se realizó el siguiente manejo:

- Manipulación y alimentación: Los animales se mantuvieron en jaulas colectivas en una sala del Bioterio para evitar situaciones estresantes que pudiesen generar temor y afectar su comportamiento. La alimentación consistió en pelet estándar para ratas y agua de bebida, esta última ad libitum. El día previo a las pruebas de observación, fueron separadas de su respectivo grupo y depositadas en una jaula previamente asignada.

- Condiciones ambientales: se mantuvieron ciclos alternados de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, (ciclo luz 8: 00 AM a 20:00 horas PM). La temperatura se mantuvo entre 18 y 22°C, no existiendo olores, ni ruidos extraños que pudieran alterar la conducta.

- Momento de medición: las observaciones se realizaron siempre en la tarde, entre las 14:00 y 18:00 hrs., con la finalidad de reducir el efecto de la hora del día sobre la conducta debido a que los roedores al ser animales nocturnos, presentan gran actividad durante la mañana y al final de la tarde (RIVAPLAMED, 1996).

- Animales: se utilizaron ratas machos para evitar la influencia de los ciclos estrales sobre el comportamiento de las hembras. Las ratas no fueron sometidas a ningún tipo de estrés físico, previo al ensayo.

- Ayuno: se estableció un período de ayuno de 24 hrs. Con la finalidad de evitar que los alimentos ingeridos interfieran en la biodisponibilidad de los fármacos administrados.

- Volumen a administrar: 0,5 ml por cada 100 g de peso vivo de las ratas.

4.2. MÉTODO.

4.2.1. Diseño Experimental: todos los animales fueron filiados con un número correlativo puesto en la base de la cola, posteriormente se asignaron al azar empleando un sistema de sorteo simple, formando 2 grupos de 15 ratas cada uno, cuya distribución fue la siguiente:

- **Grupo 1:** control negativo, con agua destilada.
- **Grupo 2:** testigo, con agua destilada más extracto de *Schizanthus grahamii* (10mg/kg). En una dilución de 2 mg/ml de la que se administra 0.5 ml/100g rata.
- Las soluciones se administraron por vía intraperitoneal.

Una vez administrado el tratamiento, se ubicaron los animales en:

1.- Caja Porta - Rata durante 20 minutos, tiempo que fue establecido como período de latencia para la absorción de la solución administrada. Transcurrido este lapso se realizaron las pruebas de comportamiento en forma individual donde se registraron las variables estipuladas en la pauta de observación programada (Anexo 1).

2.- Campo Abierto con agujeros durante 10 minutos (Anexo 2).

3.- Observación en Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico por un tiempo de 5 minutos, durante los cuales se registraron las variables estipuladas en la pauta de observación programada (Anexo 3).

4.- Pentobarbital Sódico en dosis de 15 mg/kg, por vía intraperitoneal, dando inicio a la prueba de Tiempo de Sueño Inducido, registrándose el tiempo de cada variable en medición (Anexo 4).

Con el fin de mantener constante las condiciones experimentales, los elementos utilizados: Caja Porta - Rata, Campo Abierto con agujeros, Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico, mesa metálica; fueron limpiados prolijamente con alcohol y toalla de papel absorbente después de realizar los experimentos con cada animal. Los animales no fueron reutilizados para evitar la tolerancia farmacodinámica y farmacocinética (Hardman y col, 2003). Una vez concluidas las pruebas, se efectuó la eutanasia de los animales, aplicando una sobredosis de Pentobarbital Sódico (80 mg/kg) por vía intraperitoneal.

4.2.1 Observación en caja porta-ratas: la observación de variables en estudio incluyó las siguientes medidas:

- 1) Evaluación de signos de función autónoma: lagrimación, salivación, acciones estereotipadas y respuesta pupilar (miosis y midriasis), son signos indicadores de la función de los órganos efectores a los impulsos de los nervios del sistema nervioso autónomo (SNA) siendo evaluados mediante inspección visual.
- 2) Clasificación de la reacción del animal frente a estímulos generales como el alejamiento de la caja porta-ratas o la manipulación.
- 3) Clasificación del nivel de actividad de la rata sin estimulación durante la observación.
- 4) Determinación del déficit sensorial mediante los siguientes estímulos:
 - Determinación de la respuesta algésica al pinzar el extremo de la cola con una pinza anatómica.
 - Evaluación de la reacción al emitir un sonido repentino cerca de la rata. (Lohse, 2000).

Todas las variables se llevaron a una escala de intensidad, originando dos tipos de clasificación:

- 1) Variables: lagrimación, salivación, reacción a la manipulación, nivel de actividad, tono muscular, respuesta algésica y reacción al ruido se designó un puntaje de 1, 2 y 3 que determinan: ausencia, moderado y manifiesto respectivamente.
- 2) Variables: piloerección, respuesta pupilar y acciones repetitivas el puntaje fue 1 ó 2 indicando ausencia o presencia respectivamente.

4.2.2 Tablero de campo abierto con agujeros: para esta prueba se elaboró una pauta de observación programada en la cual se consideró como el tiempo total de la observación 10 minutos, dividido en dos intervalos de 5 minutos cada uno para facilitar la interpretación de las variables (0 a 5 minutos y 5 a 10 minutos).

Las variables en observación se clasificaron como:

- Motoras de exploración.
- Emotividad.

Variables motoras de exploración:

- Cuadrados avanzados: número de cuadrados avanzados en los intervalos de 0 a 5 min., 5 a 10 min. y minutos totales.
- Posiciones bípedas: veces en que la rata adoptó la posición vertical apoyada en sus extremidades posteriores y cola durante los intervalos de 0 a 5 min., 5 a 10 min. y minutos totales.
- Intromisiones en los agujeros: veces en que la rata introdujo su cabeza en los agujeros del tablero en intervalos de 0 a 5 min., 5 a 10 min. y minutos totales.

Variables de emotividad:

- Crotines: número de bolos fecales evacuados por el animal en el tablero, en intervalos de 0 a 5 min., 5 a 10 min. y minutos totales.
- Aseos: número de ocasiones en que la rata compuso su pelaje, utilizando su lengua y extremidades anteriores, en intervalos de 0 a 5 min., 5 a 10 min. y minutos totales.
- Duración de los aseos: tiempo medido en segundos que empleó la rata para acicalarse, en intervalos de 0 a 5 min., 5 a 10 min. y minutos totales. (CYTED, 1998).

4.2.2. Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico: esta prueba está basada en un modelo propuesto por Pellow y col. (1985), para ser usado en ratas. Los brazos tienen diferentes características (FIGURA 1) de tal manera, que ofrecen un estímulo graduado de ansiedad para la rata (Ruarte y Alvarez, 1999)

Se midieron las siguientes variables, registrándose el tiempo en minutos:

- El tiempo de permanencia en la plataforma central.
- El número de entradas y el tiempo de permanencia en el brazo abierto (Zona 1).
- El número de entradas y el tiempo de permanencia en el brazo cerrado de dos paredes simétricas (Zona 2).
- El número de entradas y el tiempo de permanencia en el brazo cerrado de dos paredes asimétricas (Zona 3).
- El número de entradas y el tiempo de permanencia en el brazo con una pared (Zona 4).
- El numero de head dipping

4.2.3. Prueba de Tiempo de Sueño Inducido por Pentobarbital Sódico: se midieron las siguientes variables, registrándose el tiempo en minutos:

- Período de Latencia para Hipnosis: Se registró el tiempo transcurrido desde la administración de Pentobarbital Sódico por vía intraperitoneal, hasta que la rata dejó de deambular y apoyó toda su región ventral, incluyendo el mentón, sobre la mesa de observación.
- Duración de Hipnosis: se registró el tiempo transcurrido desde que la rata dejó de deambular y apoyó toda su región ventral, incluyendo el mentón, sobre la mesa de observación, hasta que perdió el reflejo de enderezamiento.
- Duración de Narcosis: se registró el tiempo transcurrido desde que la rata perdió el reflejo de enderezamiento, hasta que lo recuperó.
- Duración de Depresión Total: Se registró el tiempo transcurrido desde que la rata dejó de deambular y apoyó toda su región ventral, incluyendo el mentón, sobre la mesa de observación, hasta que se recuperó totalmente y volvió a deambular.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos en ambas pruebas realizadas fueron procesados mediante el paquete estadístico “GraphPad Prism TM” versión 4.0 y se utilizó una planilla de cálculo Excel. Los resultados obtenidos se expresaron como medias aritméticas y su error estándar.

Se utilizó como nivel de significancia 0,05 siendo significativo un $p \leq 0,05$ y no significativo un $p > 0,05$ (Naranjo y Bustos, 1992). Además se realizaron pruebas inferenciales intergrupos, paramétricas y no paramétricas. La metodología estadística aplicada en el análisis de los valores obtenidos fue la siguiente:

- Al cumplirse los resultados de normalidad y homocedaticidad se recurrió al análisis de varianza paramétrico (Anova) de una vía, cuyo objetivo fue comparar promedios de dos o más grupos de datos (Domenech, 1980).
- Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usando en los casos en el que Anova paramétrico resultó significativo (Zar, 1974).
- Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal – Wallis, que fue utilizado en casos de no cumplirse los requisitos de normalidad y/o homocedaticidad de los datos (Siegel, 1996).
- Prueba de comparaciones múltiples no paramétrico de Dunn, esta prueba fue aplicada en los casos en el que la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativa (Hollander y Wolfe, 1973).
- Se utilizó la prueba t de Student de datos pareados, para realizar las comparaciones intergrupo de las variables.

5. RESULTADOS

5.1. OBSERVACIÓN EN CAJA PORTA-RATA.

En esta prueba se registraron variables de tipo cualitativo que son de utilidad para analizar el estado fisiológico y conductual de la rata en un entorno que le es conocido, donde no existen factores ansiogénicos. (Anexo 6 y 7).

5.1.1. Lagrimación: La variable no se presentó en ninguno de los grupos en estudio.

5.1.2. Salivación: La variable no se presentó en ninguno de los grupos en estudio.

5.1.3 Piloerección: no presentó diferencias significativas entre el grupo Control y Schizanthus.

5.1.4 Nivel de actividad: Schizanthus presentó actividad manifiesta en un 26%, moderada en un 53% y ausencia de actividades un 21%. En el grupo Control la actividad manifiesta fue de un 0%, actividad moderada en un 27% y ausencia 73%. (Gráfico 2, Anexo 2 y 3).

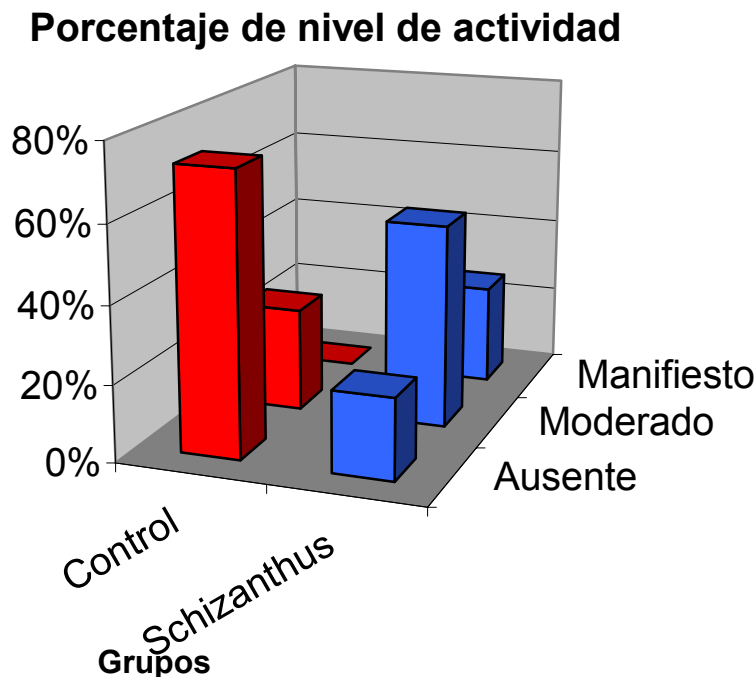


Gráfico 1: Nivel de actividad, expresado en porcentajes, en ratas tratadas con Agua destilada y Schizanthus, n = 15 ratas por grupo.

5.1.5 Reacción al ruido: no presentó diferencias significativas entre el grupo Control y Schizanthus.

5.1.6. Respuesta algésica al pinzar la cola: no presentó diferencias significativas entre el grupo Control y Schizanthus.

5.1.7 Reacción a la manipulación: no presentó diferencias significativas entre grupo Control y Schizanthus.

5.1.8. Tono muscular: en esta variable, el 100% del grupo Control presento tono muscular moderado, y en el grupo Schizanthus 26,7% presentaron tono muscular aumentado o manifiesto y 73,3 moderado. (Gráfico 3).

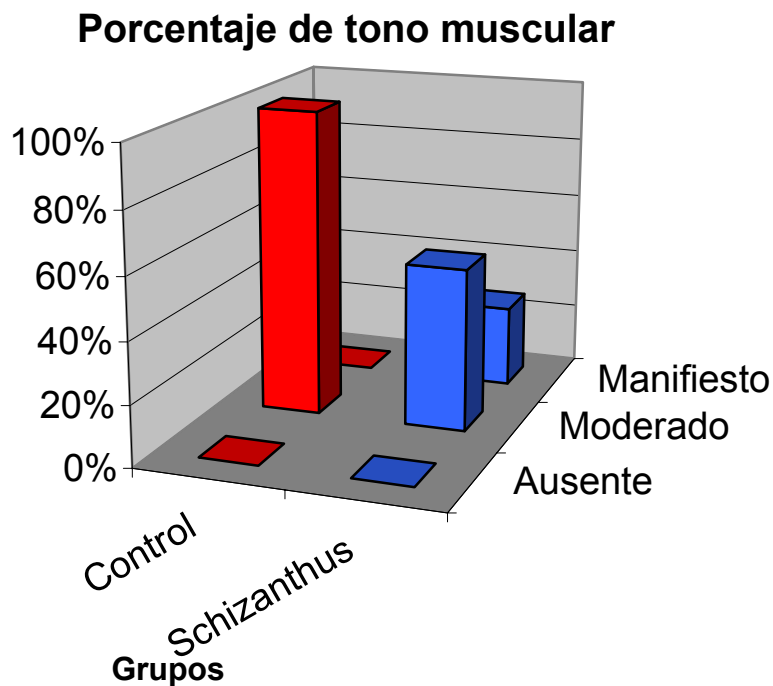


Gráfico 2: Tono muscular, expresado en porcentajes, en ratas tratadas con Agua destilada y *Schizanthus*, n = 15 ratas por grupo.

5.1.9. Respuesta pupilar: se presentó en todos los animales de ambos grupos.

5.1.10. Acciones repetitivas: No se observó en los grupos Control y Schizanthus.

5.2 TABLERO DE CAMPO ABIERTO CON AGUJEROS.

5.2.1 Cuadrados avanzados.

En el análisis entre grupos de los resultados de la variable Cuadrados avanzados, del minuto 0 al minuto 5, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) (Gráfico 4, Anexo 4).

En el periodo 5 a 10 minutos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Anexo 4).

En el total de 10 minutos se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) (Gráfico 5, Anexo 4).

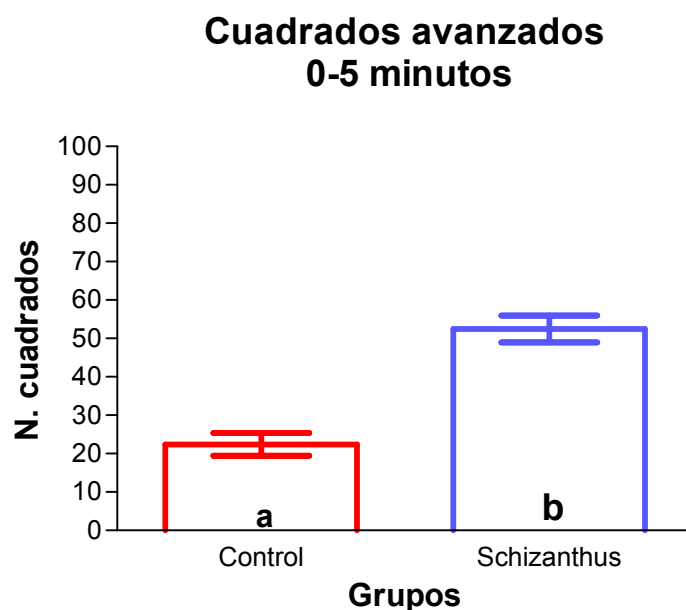


Gráfico 3: Número de Cuadrados Avanzados por las ratas de los grupos Control y Schizanthus en los minutos 0 a 5. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

* Letras distintas indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$)

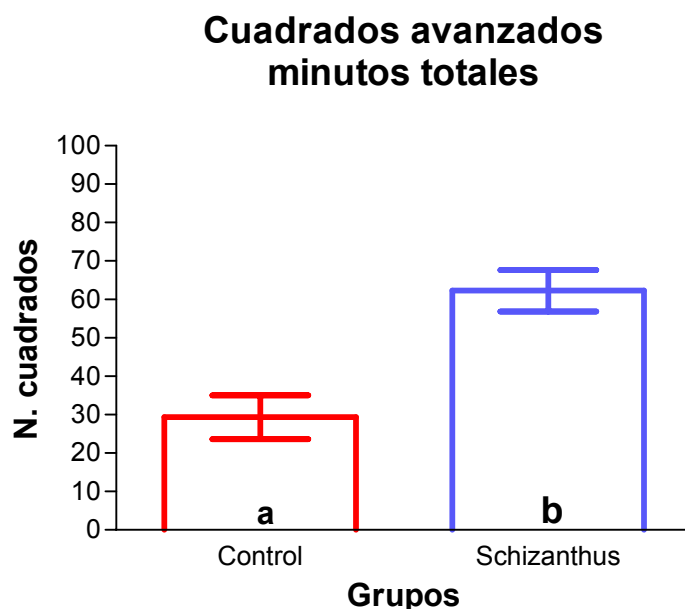


Gráfico 4: Número total de Cuadrados Avanzados por las ratas de los grupos Control y Schizanthus en el total de los minutos 0 a 10. Expresados como medias aritméticas y su error típico*

5.2.2 Posiciones bípedas.

El análisis de los resultados de las variables posiciones bípedas realizadas por las ratas durante los primeros 5 minutos, en el grupo control resultó ser menor y presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al grupo Schizanthus. (Gráfico 6, Anexo5).

En el periodo 5 a 10 minutos los resultados de la variable no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexo5).

Para los minutos totales el grupo Schizanthus presentó diferencias significativas con respecto al grupo control ($p \leq 0,05$) (Gráfico 7, Anexo5).

* Letras distintas indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$)

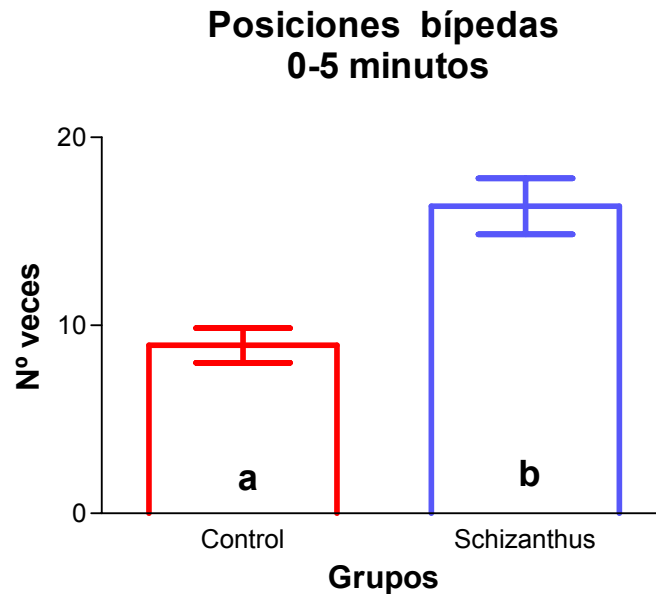


Gráfico 5: Número de Posiciones Bípedas realizadas por las ratas de los grupos Control y Schizanthus en los minutos 0 a 5. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

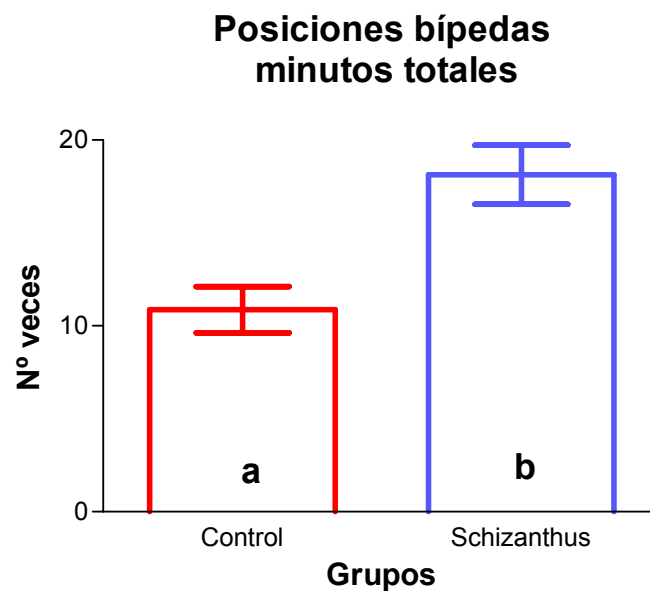


Gráfico 6: Número total de Posiciones Bípedas realizadas por las ratas de los grupos Control y Schizanthus en el total de minutos 0 a 10. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

* Letras distintas indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$)

5.2.3 Intromisiones en agujeros.

El análisis entre grupos de los resultados de la variable Intromisiones en agujeros durante los minutos 0 al 5, los minutos 5 al 10 y el total durante 10 minutos reveló que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). (Anexo 6).

5.2.4 Crotines.

En el análisis intergrupos de los resultados de la variable Crotines eliminados por las ratas en el Tablero de campo abierto con agujeros, Durante el periodo de 0 a 5 minutos y en minutos totales el grupo Schizanthus fue distinto del grupo control, porque las ratas en este último grupo no defecaron durante estos periodos de tiempo (Gráfico 8 y 9). (Anexo 7).

En el periodo de 5 a 10 minutos ninguno de los dos grupos presento defecacion en este periodo de tiempo (Anexo 7).

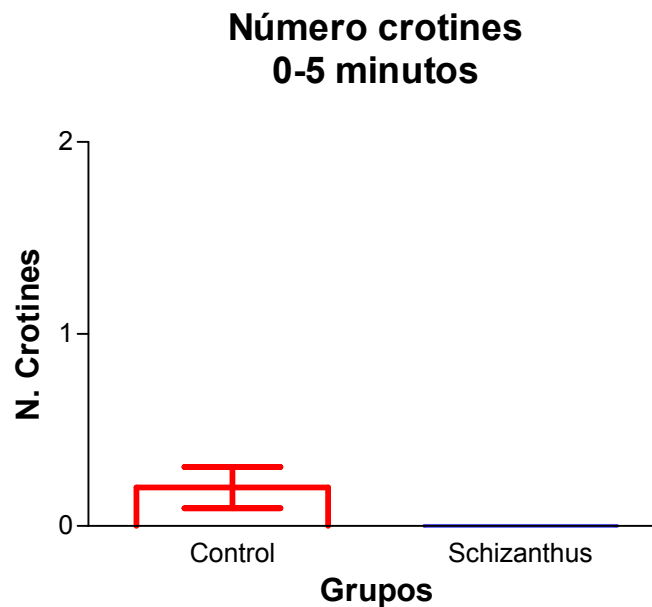


Gráfico 7: Número de Crotines eliminados por las ratas de los grupos Control y Schizanthus en los minutos 0 a 5. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

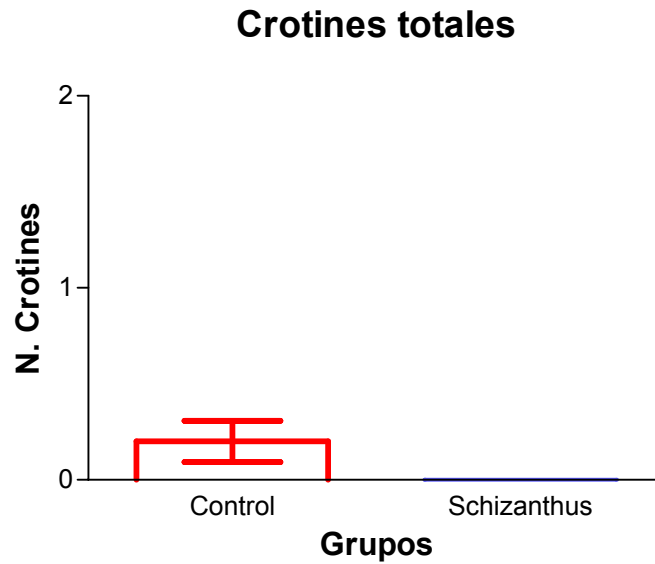


Gráfico 8: Número total de Crotines eliminados por las ratas de los grupos Control y Schizanthus. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

5.2.5 Número de aseos

El análisis entre grupos de los resultados de la variable Número de aseos, durante los minutos 0 al 5, los minutos 5 al 10 y el total durante 10 minutos no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). (Anexo 8).

5.2.6 Duración Aseos

El análisis entre grupos de los resultados de la variable Duración de aseos, durante los minutos 0 al 5, los minutos 5 al 10 y el total durante 10 minutos reveló que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). (Anexo 9).

5.3. Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (LCEA).

5.3.1. Tiempo de permanencia en plataforma central.

El análisis de los resultados de tiempo de permanencia, no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre el grupo Control y Schizanthus (Gráfico 11) (Anexo 11).

5.3.2. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo abierto (zona 1).

El análisis de los resultados de número de entradas y de tiempo de permanencia no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los grupos en estudio (Gráfico 10 y 11) (Anexo 10 y 11).

5.3.3. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo cerrado de paredes simétricas (zona 2).

El análisis de los resultados de número de entradas y de tiempo de permanencia no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los grupos en estudio (Gráfico 10 y 11) (Anexo 10 y 11).

5.3.4. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo cerrado de paredes asimétricas (zona 3).

El análisis de los resultados de número de entradas y de tiempo de permanencia no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los grupos en estudio (Gráfico 10 y 11) (Anexo 10 y 11).

5.3.5. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo de una pared (zona 4)

El análisis de los resultados de número de entradas y de tiempo de permanencia no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los grupos en estudio (Gráfico 10 y 11) (Anexo 10 y 11).

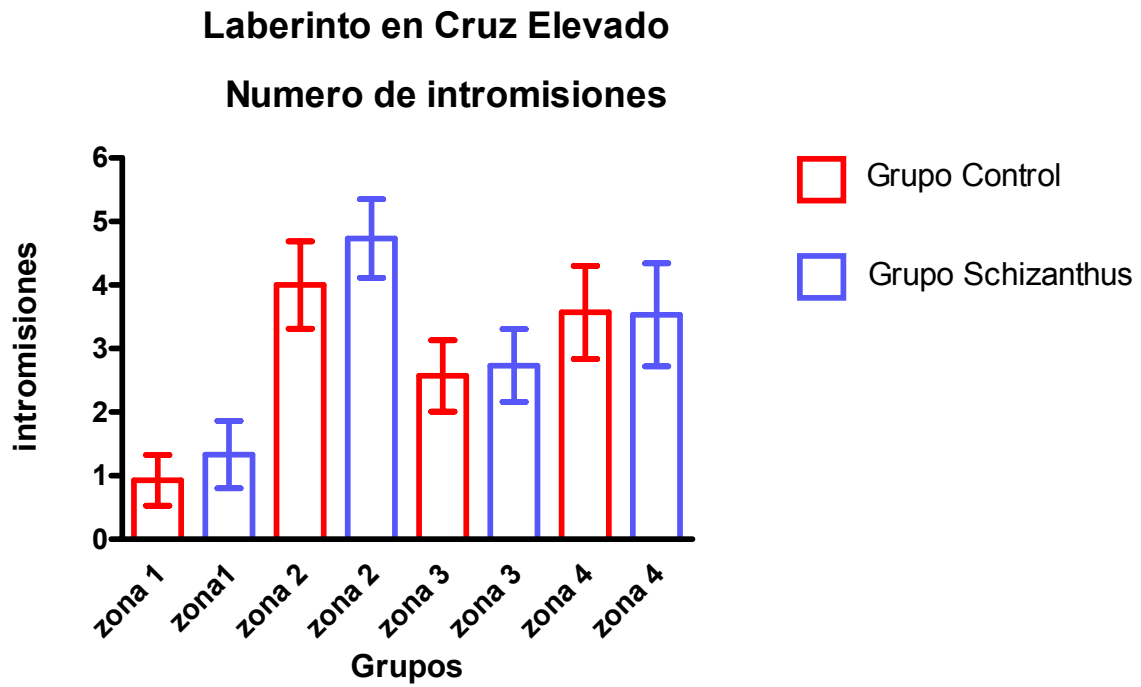


Gráfico 10: Numero de intrusiones en el Laberinto en Cruz Elevado, realizados por las ratas de los grupos Control y Schizanthus. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

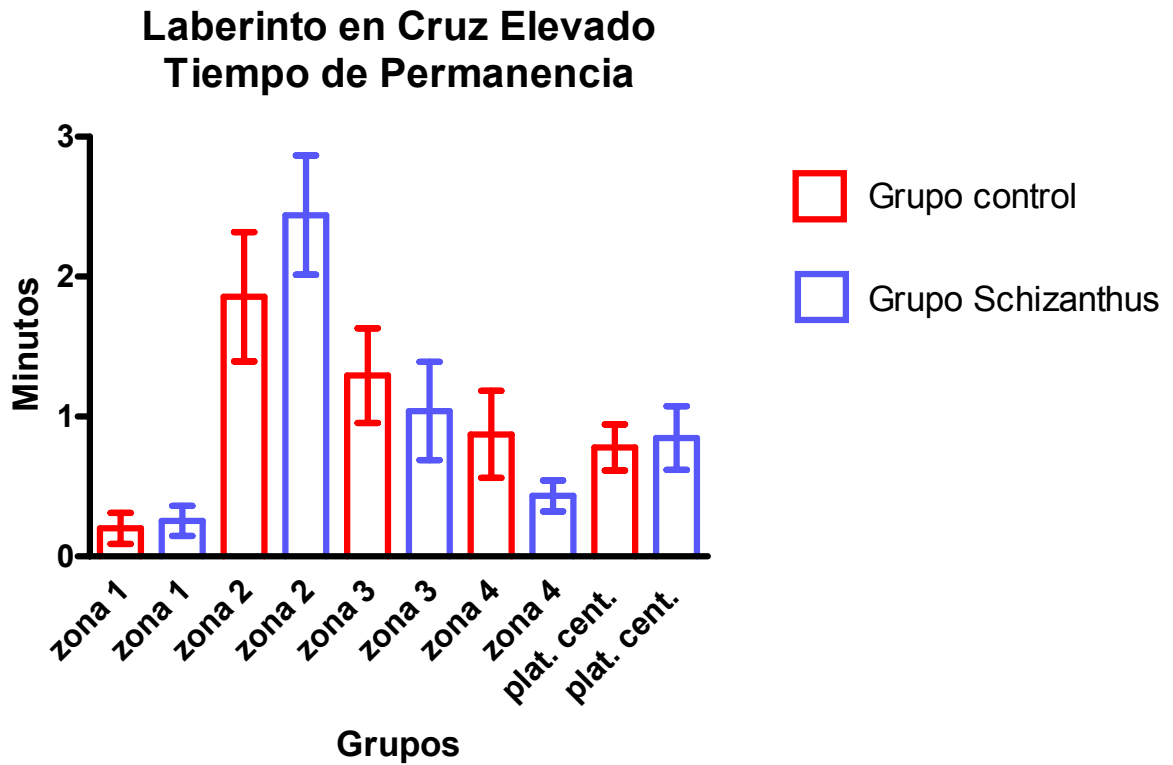


Gráfico 11: Tiempo de permanencia en el Laberinto en Cruz Elevado, realizados por las ratas de los grupos Control y Schizanthus. Expresados como medias aritméticas y su error típico*.

5.4. Número de head dipping.

5.4.1. Número de head dipping: En el análisis estadístico de esta variable se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo Control y el grupo *Schizanthus* (Gráfico 12) (Anexo 12).

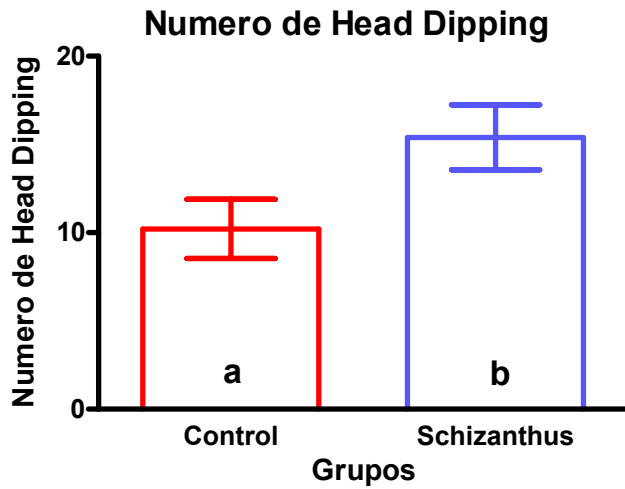


Gráfico 12: Número de head dipping en el Laberinto en cruz elevado de las ratas de los grupos Control y *Schizanthus*. Expresados como medias aritméticas y su error típico.

* Letras distintas indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$)

5.5. PRUEBA DE TIEMPO DE SUEÑO INDUCIDO POR PENTOBARBITAL SODICO.

5.5.1. Período de Latencia para Hipnosis.

El análisis de los resultados de esta variable, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos Control y Schizanthus (Gráfico 13) (Anexo 13).

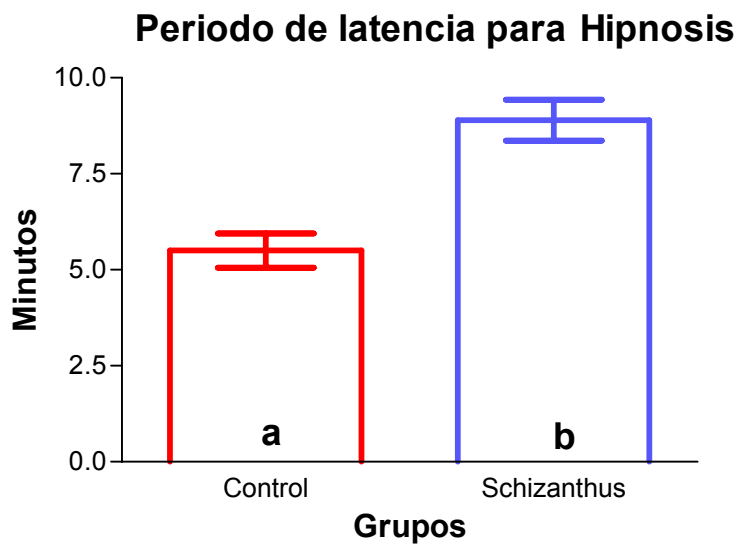


Gráfico 13: Período de Latencia para Hipnosis de las ratas de los grupos Control y Schizanthus. Resultados expresados en minutos, como medias aritméticas \pm E.E.*

5.5.2. Hipnosis.

La variable hipnosis coincide con Duración de Depresión Total.

5.5.3. Narcosis.

La variable narcosis no se presentó en ninguno de los grupos en estudio.

* Letras distintas indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$)

5.5.4. Duración de Depresión Total:

El análisis de los resultados de esta variable, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo Control y Schizanthus. (Gráfico 14) (Anexo 13).

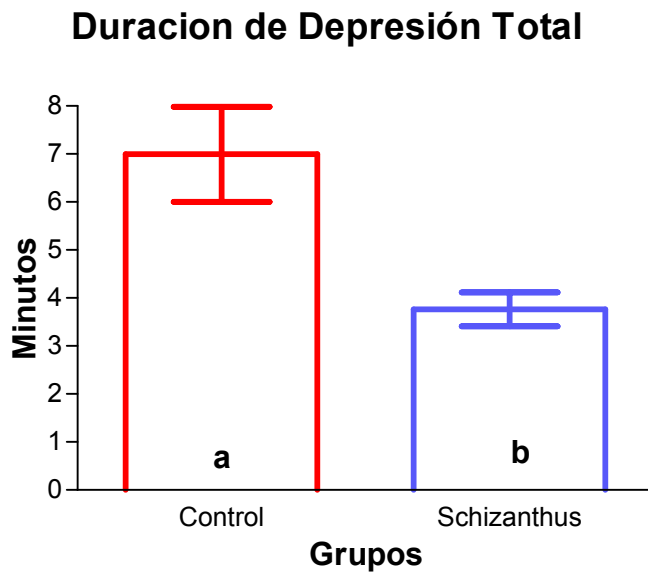


Gráfico 14: Duración de Depresión Total de las ratas de los grupo Control y Schizanthus. Resultados expresados en minutos, como medias aritméticas \pm E.E.*

* Letras distintas indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$)

6. DISCUSIÓN

6.1. OBSERVACIÓN EN CAJA PORTA RATAS

6.1.1. Lagrimación.

La variable lagrimación corresponde a una respuesta autónoma preponderantemente de tipo colinérgico o parasimpáticomimético (Hardman y col., 2003). En este estudio no se presentó lagrimación ni sequedad de conjuntiva ocular, por lo que se puede concluir que los alcaloides del tropano presentes en *Schizanthus grahamii* no produjeron un efecto anticolinérgico evidenciable en este territorio efector, que acorde a la literatura (Hardmann y col., 2003; Offermanns y Rosenthal, 2004; Kay y Wesnes, 2005) poseería los receptores muscarínicos M_1 y M_3 .

Los receptores muscarínicos M_3 están presente en las glándulas y músculo liso en distintas proporciones por lo que este fenómeno es posible de explicar, debido a la alta especificidad de los alcaloides obtenidos, que podrían actuar en un tipo de receptor muscarínico, presente en mayor proporción en el músculo liso y no en los receptores de otros tejidos como ocurre con la darifenacina, un antagonista muscarínico selectivo del receptor M_3 de vejiga urinaria, de última generación, que se utiliza en el tratamiento de vejiga hiperactiva y que no genera los efectos adversos de los antagonistas muscarínicos como atropina (Kay y Wesnes, 2005).

6.1.2. Salivación.

En los grupos tratados no se detectó sequedad de boca y mucosa bucal, esto se debería a que los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii*, por su especificidad no poseen afinidad por los receptores muscarínicos M_3 de las glándulas salivales. Lo mismo podría suceder para los receptores M_1 , estos receptores en conjunto son los que comandan las secreciones de éstas glándulas (Hardman y col., 2003).

Se ha comprobado que cuando se utiliza un fármaco bloqueador específico del receptor M_3 , la sequedad de boca, no es evidenciable en el total de los individuos tratados, esto debido a que para obtener sequedad bucal evidente se deben bloquear, los receptores muscarínicos M_1 y M_3 conjuntamente.

6.1.3. Piloerección.

La variable piloerección se presentó en 3 ratas del grupo tratado con *Schizanthus grahamii*, en el grupo Control, 2 ratas presentaron piloerección. Los alcaloides del tropano de *Schizanthus grahamii* no producirían piloerección porque no tienen un efecto adrenérgico, (Booth y McDonald., 1988; Rang y Dale., 1995; Flores, 1997; Katsung, 1999; Hardman y col., 2003).

6.1.4. Actividad.

Debido a que en el grupo Control presento una significativa menor actividad que el grupo Schizanthus, por lo que se concluye que los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii* presentan una acción estimulante sobre el SNC, donde existiría principalmente una población de receptores muscarínicos M₁ y M₄.

Los alcaloides tipo tropano presentes en el extracto atraviesan la barrera hematoencefálica ejerciendo su efecto bloqueador colinérgico en uno o en ambos receptores muscarínicos y esto es explicable como resultado de la estimulación del bulbo raquídeo y de los centros cerebrales superiores, tal como ocurre cuando se administran altas dosis de atropina o escopolamina. Antes se buscaban los efectos depresivos y amnésicos cuando se administraba escopolamina como auxiliar de los anestésicos o como premedicación anestésica. Sin embargo en presencia de dolor las mismas dosis de escopolamina originan excitación, inquietud, y algunas veces alucinaciones o delirio (Hardman y col., 2003).

6.1.5. Reacción al ruido.

La reacción al ruido no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio, esto podría deberse a que la intensidad del efecto de los alcaloides del tropano o bien el sitio en que estos ejercen mayoritariamente su actividad en el sistema nervioso, no condicionó una modificación de los umbrales de sensibilidad frente a estímulos sonoros, lo suficiente para que se evidencie una diferencia.

Es importante destacar que la metodología utilizada es válida ya que la frecuencia del sonido medido, fue la adecuada para inducir estrés o molestia en ambos grupos de animales utilizados (Warfield, 1973; Peterson, 1980).

6.1.6. Respuesta algésica al pinzar la cola.

Los grupos Schizanthus y Control se comportaron de manera similar. Ambos grupos presentaron una respuesta moderada, esto coincide con la literatura (Hardman y col., 2003), que no describe efectos analgésicos centrales o periféricos a los bloqueadores colinérgicos, el alivio al dolor cólico que condicionan es claramente por una relajación del músculo liso intestinal y no por una depresión de las vías del dolor.

6.1.7. Manipulación al retirar la rata.

No presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio, esto podría deberse a que la intensidad del efecto de los alcaloides del tropano o bien el sitio en que estos ejercen mayoritariamente su actividad en el sistema nervioso, no condicionó una modificación conductual evidenciable en reacciones de temor o agresividad en el momento de tratar de tomar la rata, esto contrasta con otros resultados del estudio tales como antagonismo de la depresión condicionada por pentobarbital sódico, en que los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii* evidencian excitación en el SNC.

6.1.8. Tono muscular.

El grupo Control presentó el total de los animales con tono muscular moderado, en el grupo *Schizanthus* se observó un predominio de tono muscular moderado y 4 de 15 ratas presentaron tono muscular aumentado, este aumento en el tono muscular, podría indicar, que de acuerdo con el efecto excitatorio que los alcaloides de *Schizanthus grahamii* inducen en el SNC estimularían el estado de alerta y además en algún grado la actividad psicomotora, lo que contribuye al aumento del tono muscular (Flores, 1997).

6.1.9. Respuesta pupilar.

Tanto en el grupo *Schizanthus* como en el grupo Control, se presentó respuesta pupilar en el total de los individuos en estudio. Esto podría ser, debido a la especificidad de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii*, que debido a su estructura química, no producen los efectos indeseados de un bloqueador colinérgico como la atropina que bloquea indiscriminadamente todos los subtipos de receptores muscarínicos. Esta ausencia de efecto bloqueador sugiere que los alcaloides de *Schizanthus grahamii* evaluados carecen de afinidad por receptores M₃ presentes en el iris.

Esto se ha observado también con preparaciones de congéneres semisintéticos de los alcaloides de la *Belladonna*, por lo general derivados del amonio cuaternario, que cambian la actividad gastrointestinal sin producir boca seca o dilatación pupilar (Hardman y col., 2003), así como también ocurre con la darifenacina que no provoca cambios a nivel ocular (Kay y Wesnes, 2005).

6.1.10. Acciones repetitivas.

En ninguno de los grupos se presentó comportamiento estereotipado concordando con lo obtenido por Ahumada (2000). Esta variable se presenta cuando se utilizan estimulantes psicomotores como apomorfina, anfetaminas, y cocaína, estas estimulan el SNC y corteza cerebral incrementando la actitud de alerta, aumenta la actividad del sistema adrenérgico mediados a través de la activación de los receptores alfa₁ (Conn, 1993; Hardman y col., 2003). Por lo que se puede inferir que *Schizanthus* no tiene actividad sobre el sistema dopaminérgico negro-estriado que tiene relación directa con el comportamiento estereotipado y que es donde actúan los estimulantes psicomotores antes mencionados.

6.2. TABLERO DE CAMPO ABIERTO CON AGUJEROS

Este tablero cumple con el requisito de ser un lugar distinto al sitio donde se encuentra habitualmente las ratas, de mayores dimensiones y con mayor iluminación, que lo convierte en un estímulo nocivo frente al cual la respuesta conductual se manifiesta con inmovilidad (Olavarria,1999). Además como esta tabla posee agujeros, permitirá adicionalmente obtener antecedentes sobre la conducta exploratoria reflejada por la curiosidad del animal al introducir su cabeza en lo agujeros (RIVAPLAMED, 1998).

6.2.1. Número de cuadrados avanzados.

Se considera que el número de cuadrados avanzados es una medida de la actividad exploratoria, el aumento de esta variable es un buen indicador de la disminución de emocionalidad (Olavarria, 1999).

Los resultados obtenidos indican que el numero de cuadrados avanzados en las ratas tratadas con *Schizanthus grahamii* fueron mayores con respecto al grupo control siendo estadísticamente significativas. Lo que estaría indicando actividad sobre el SNC , de tipo estimulante, esto debido a que, los alcaloides presentes en el extracto atraviesan la barrera hematoencefálica provocando algún grado de excitación tal como ocurre cuando se administran altas dosis de atropina o escopolamina (Hardman y col., 2003)

En un estudio comparativo de distintos estimulantes del SNC Shannon y Peters (1990) compararon agentes colinérgicos y dopaminérgicos, escopolamina, apomorfina y Anfetamina, entre otros estimulantes, que indujeron hiperactividad en ratones. Entre los grupos Anfetamina y escopolamina, en dicho ensayo se obtuvieron respuestas similares en el efecto.

6.2.2. Número de posiciones bípedas en el tablero de campo abierto.

La posición bípeda de la rata implica una actitud de exploración en un medio que le es desconocido y para facilitar la toma de conocimiento de él, trata de aumentar su campo visual irguiéndose (Merino, 1995).

Las posiciones bípedas deben ser consideradas como indicadores, tanto de actividad ansiolítica, porque es una actividad que demuestra cierto grado de tranquilidad en un ambiente extraño y a la vez es un parámetro relacionado a la actividad exploratoria (RIVAPLAMED, 1998).

La elevada actividad que desarrollaron los grupos en estudio durante los primeros minutos, reflejó una conducta exploratoria superior al inicio de la prueba, esto es debido a al estímulo ansiogénico que provoca un ambiente desconocido.

El grupo *Schizanthus* obtuvo mayor número de posiciones bípedas totales, presentándose diferencias estadísticamente significativas. Al igual que en la variable anterior, indica actividad de estos alcaloides sobre el SNC, de tipo estimulante.

6.2.3. Intromisión en los agujeros.

Esta variable mide básicamente la curiosidad del animal, lo que se favorece cuando la rata se encuentra tranquila y familiarizada con el medio, se considera que la curiosidad es un acto instintivo, pero al enfrentarse a una situación novedosa pueden originar 2 tipos de respuesta: aproximación hacia el estímulo o bien producir una anulación de éste. Se utiliza como indicativo del estado de ansiedad o depresión del animal al evaluar el comportamiento de los psicofármacos sobre el SNC del animal (CYTED, 1998).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio. Esto es debido a que la actividad exploratoria se realizó principalmente por las orillas del campo abierto, fenómeno conocido como tigmotaxis, por lo que el animal no explorara el área central a menos que contenga objetos con algún posible interés (Conn, 1993).

Durante el transcurso de la prueba todos los grupos presentaron una disminución de las intromisiones a través del tiempo, lo cual se atribuye a que las respuestas exploratorias exhiben una declinación lineal al transcurrir el tiempo (Archer, 1973; Conn, 1993).

6.2.4. Número de crotines en el tablero de campo abierto.

Hay diversas interpretaciones, una de ellas considera la defecación como un indicador de emocionalidad del animal, ya que al encontrarse en un territorio desconocido provoca una mayor actividad del sistema autónomo lo que es reflejado con un aumento del tono y peristálsis intestinal (Álvarez, 2000).

El número de crotines fue muy escaso en el grupo control, debido al ayuno de 24 horas que lleva a una disminución del contenido gastrointestinal, esto explicaría la reducida cantidad y frecuencia de defecaciones con respecto a la cantidad y frecuencia normales para una rata con alimentación ad libitum.

En el grupo *Schizanthus* no se presentaron defecaciones. La ausencia de defecaciones se puede explicar debido al efecto bloqueador colinérgico de los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii* que disminuyen el tono, así como la motilidad del intestino, debido a su afinidad con los receptores muscarínicos colinérgicos presentes en el intestino (Ponce, 2002).

6.2.5. Número de aseos.

La rata tiene la conducta de asear su piel en forma continua, sin importar si presenta o no suciedad, es una actividad de tipo espontánea, al hacer esto deja de prestar atención en el medio, lo que la hace susceptible al ataque de los depredadores (Olavarría, 1999).

Esta variable del comportamiento es un tanto paradójica, ya que el acicalamiento es utilizado por el animal para el cuidado de su piel, pero también puede ser usado para disminuir el estrés y el dolor, así como también para disminuir la incidencia de enfermedades de transmisión sexual, además esta asociado con la termorregulación y comunicación social; el estudio de esta variable es una buena herramienta en la evaluación de algunos péptidos como

las endorfinas, adrenocorticotrofina, hormona α -melanocito-estimulante, los que inducen un excesivo acalamiento por parte de los individuos tratados (Conn, 1993).

En esta variable no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio.

Esto es posible porque los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii* no producen efectos ansiolíticos o ansiogénicos que modifiquen este parámetro conductual. Tampoco se ven afectados los centros cerebrales superiores (sistema hipotálamo – adrenal – pituitaria) relacionados con este comportamiento como esta descrito por Conn (1993).

6.2.6. Duración de los aseos.

Al disminuir el grado de tensión emocional la rata manifiesta un aumento de los aseos dedicando el mayor tiempo posible a esa actividad, siempre y cuando algún estímulo no la perturbe y la haga volver a su normal estado de alerta (Merino, 1995).

En esta variable no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio. Debido a que los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii* no tienen efecto ansiolítico ni tampoco ansiogénico.

6.3. PRUEBA DE LABERINTO EN CRUZ ELEVADO ASIMÉTRICO (LCEA):

Esta prueba es actualmente muy aceptada para medir efectos ansiolíticos en el modelo animal porque permite una rápida evaluación farmacológica de las drogas que tienen efectos ansiolíticos (Conn, 2003). Su validez se sustenta en que sólo los fármacos ansiolíticos mejoran la frecuencia de ingresos y tiempo de permanencia en los brazos abiertos, en tanto que no se producen cambios conductuales significativos al administrar otros psicofármacos, como por ejemplo, antidepresivos y neurolepticos (Pascual y col., 2003).

6.3.1. Tiempo de permanencia en la plataforma central.

El tiempo de permanencia en la plataforma central, es considerado como un tiempo en que la rata se encuentra en una zona de conflicto, donde toma la decisión de dirigirse a uno de los cuatro brazos (RIVAPLAMED, 1998).

En este estudio no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), esto debido a que los alcaloides presentes en el extracto de *Schizanthus grahamii* no provocan ansiogénesis ni ansiolisis, siendo estos los efectos a evaluar en este modelo animal.

6.3.2. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo abierto (zona 1):

Las ratas evitan ingresar a este brazo por la sensación de miedo que les provoca. Esta sensación está condicionada por dos factores. El primero, es la luminosidad, ya que las ratas sienten rechazo por los lugares iluminados. El otro factor es la ausencia de paredes, que no les

permite realizar tigmotaxis. El aumento del número de entradas y tiempo de permanencia en este brazo, es un claro indicador de menor ansiedad por parte de las ratas (Ruarte y col. 1997).

El análisis intergrupo de los resultados de ambas variables no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), la explicación presentada en el ítem anterior es válida también para número de entradas y tiempo de permanencia en brazo abierto ya que los alcaloides administrados al grupo tratado, no inducen cambios en la ansiogénesis ni tampoco en la ansiólisis (Conn, 1993).

6.3.3. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo cerrado de dos paredes simétricas (zona 2).

El número de entradas en esta zona, es un factor relacionado con la exploración del espacio por parte del animal, y es importante que sea registrado, con el objeto de considerar el número total de entradas como un indicador de actividad locomotora (RIVAPLAMED, 1998). Los resultados obtenidos en este estudio, reflejan que la actividad locomotora del grupo Schizanthus y Control, no se vio afectado.

El análisis intergrupo de los resultados de esta variable, no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Esto se debe a que este test es fisiológica y farmacológicamente útil, para mensurar los efectos en el comportamiento de las ratas y ratones y con esto, evaluar algún efecto ansiolítico o ansiogénico (Conn, 1993).

6.3.4. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo cerrado de dos paredes asimétricas (zona 3).

Según Ruarte y Alvarez (1999), se presenta una alta exploración y permanencia en esta zona, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. El número de entradas en esta zona es un indicador de actividad locomotora por parte de las ratas (RIVAPLAMED, 1998), el cual no se vio afectado, ya que las ratas del grupo Schizanthus, ingresaron similar número de veces que el grupo Control, no presentando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

El tiempo de permanencia en este brazo fue similar para los dos grupos, ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), esto es debido a lo postulado por Conn (1993). Este resultado no era esperado, ya que podría haber sido mayor para el grupo Schizanthus, por los efectos excitatorios que se evidencian en las otras pruebas, pero este resultado no afecta la interpretación final, en la que se necesita la batería de pruebas para llegar a una conclusión final.

6.3.5. Número de entradas y tiempo de permanencia en el brazo de una pared (zona 4).

El número de entradas en esta zona es un indicador de actividad locomotora por parte de las ratas (RIVAPLAMED, 1998), el cual no se vio afectado, el número de entradas y permanencia de ambos grupos fue similar, no presentando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), esto es de acuerdo a lo que el test busca que es determinar grados de ansiogénesis o ansiólisis en los animales (Conn, 1993).

6.3.6. Numero de Head dipping

El head dipping, es un patron de comportamiento, realizado en plataformas abiertas del laberinto en cruz elevado y caracterizado por una investigación visual hacia abajo, se puede considerar una manifestación del gravamen de riesgo relacionada con la ansiedad o con una conducta exploratoria que puede estar aumentada o disminuida por algún estimulante o depresor. Head dipping fue registrado cuando el animal se paro en el borde de la plataforma, con la cabeza doblada hacia abajo y realizando una investigación visual hacia abajo (nivel del ojo debajo de la superficie de la plataforma) (Hoshino y col., 2004).

El número de head dipping fue mayor en el grupo Schizanthus, habiendo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo Control.

Se considera que presenta una acción estimulante sobre el SNC, esto debido a que, los alcaloides presentes en el extracto atraviesan la barrera hematoencefálica provocando algún grado de excitación, lo que explicaría el aumento de la capacidad exploratoria, como ocurre cuando se administran altas dosis de atropina o de escopolamina (Hardman y col., 2003).

6.4. PRUEBA DE TIEMPO DE SUEÑO INDUCIDO POR PENTOBARBITAL SÓDICO.

6.4.1. Período de Latencia para Hipnosis.

El grupo control, presentó el menor tiempo de los dos grupos, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo Schizanthus.

En el estudio se pudo determinar un efecto de los alcaloides de *Schizanthus grahamii* frente al efecto anestésico de Pentobarbital, esto es comparable a lo obtenido por ahumada (2000). Los animales medicados con estimulantes psicomotores, elevan el estado de alerta y a la vez disminuye el grado de depresión central provocado por distintas drogas (Booth y Mc Donald, 1988; Rang y Dale, 1995).

Un anestésico produce las diferentes fases del estado anestésico a través de acciones en distintos sitios anatómicos del SNC y puede generar estos efectos mediante múltiples acciones celulares o moleculares (Antkowiak, 2001). Los anestésicos generales podrían interrumpir funciones del SNC en millares de niveles, con inclusión de neuronas sensitivas periféricas, medula espinal, tronco y corteza cerebral (Hardman y col., 2003).

6.4.2. Duración de Hipnosis.

Duración de hipnosis es el tiempo transcurrido desde que la rata deja de deambular y apoya toda su región ventral, incluyendo el mentón, sobre la mesa de observación, hasta que pierde el reflejo de enderezamiento (Muir y col., 2001).

Las ratas de ambos grupo no presentaron narcosis, por lo que hipnosis coincide con los resultados obtenidos en Duración de Depresión Total.

6.4.3. Duración de Narcosis.

Las ratas del grupo *Schizanthus* no entraron en narcosis, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Ahumada (2000) donde se utilizó un estimulante del SNC. Este efecto es producido por ciertos estimulantes que aumentan la actividad sicomotora y a la vez disminuyen el grado de depresión central provocado por distintas drogas (Booth y Mc Donald, 1988; Rang y Dale, 1995).

En el estudio se pudo determinar un efecto de tipo excitatorio de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* que se contraponen al efecto anestésico del Pentobarbital, esto es comparable a lo obtenido por Ahumada (2000) donde fue utilizado un estimulante del SNC.

6.4.4. Duración de Depresión Total.

El principal mecanismo que limita la duración de la anestesia después de dosis únicas es la redistribución de estos medicamentos hidrófobos desde el encéfalo a otros tejidos (Hardman y col., 2003).

Como los mecanismos de acción de los anestésicos generales es compleja no es posible saber como interactúan Pentobarbital y los alcaloides de *Schizanthus grahamii* posiblemente el efecto obtenido es debido exclusivamente al efecto excitatorio que producen los alcaloides y no a alguna interacción entre los dos fármacos o algún tipo de competencia, o sea un antagonismo en el efecto y no farmacodinámico (Hardman y col, 2003).

El tiempo que duró este período fue menor para el grupo *Schizanthus*, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con el grupo Control. Lo que significa, que los alcaloides de *Schizanthus grahamii* frente al anestésico Pentobarbital tienen un comportamiento antagonista en su efecto. Esto es explicable por el efecto que los estimulantes psicomotores producen, elevando el estado de alerta y la disminución de la depresión en el SNC inducido por algunos medicamentos (Rang y Dale, 1995).

6.5. Proyecciones y Recomendaciones

Los fármacos bloqueadores colinérgicos que están a la disposición de los médicos cirujanos y médicos veterinarios actualmente, son bastante efectivos desde el punto de vista del logro del bloqueo de receptores colinérgicos muscarínicos, lo que contribuye a su éxito terapéutico, pero desafortunadamente se presentan las denominadas reacciones adversas esperadas, prácticamente en la totalidad de los pacientes tratados, con manifestación de: taquicardia, sequedad de piel y mucosas, aumento del diámetro pupilar con la consecuente fotofobia. Todo lo anterior debido al bloqueo no selectivo por parte de atropina, escopolamina y algunos de sus derivados de la totalidad de los subtipos de receptores muscarínicos (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅).

Como proyección se puede plantear que las estructuras derivadas del anillo tropano y obtenidas de *Schizanthus grahamii* han sido previamente valoradas con otros modelos animales en digestivo y cardiovascular y existen fuertes evidencias de un efecto anticolinérgico de mayor selectividad sobre los subtipos de receptores M₂ y M₃ presentes en estos tejidos.

Al igual como algunos de los fármacos anticolinérgicos muscarínicos que provocan cambios en el SNC y que están siendo estudiados, para lograr minimizar los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Por la capacidad de los alcaloides obtenidos de *Schizanthus grahamii* para pasar a través de la barrera hematoencefálica, podrían ser evaluados en su efecto farmacológico, para el posible tratamiento de esta enfermedad con reducción de los efectos no deseados.

Es importante recomendar, para mayor precisión en la obtención de algunas de las variables en estudio, refinar la metodología utilizada, se podría reducir el error del observador en el parámetro que mide la inducción de dolor por pinzamiento de la cola con el uso de un aparato llamado tail - flick que mide el tiempo que demora en retirar la cola de un obturador al ser sometido a un dolor provocado por emisión de calor, este aparato es ampliamente usado en Estados Unidos y Europa en pruebas de evaluación de analgésicos.

Finalmente la acción de los alcaloides de *Schizanthus grahamii* puede evaluarse por su respuesta clínica, por lo que debieran ser aplicadas nuevas investigaciones dirigidas a determinar los mecanismos de acción específicos por los cuales actúan dichos alcaloides, con el fin de contribuir a la obtención de nuevos fármacos.

6.6. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con ratas machos Sprague Dawley, en el presente trabajo, es posible concluir que el extracto de *Schizanthus grahamii* en la prueba de:

1. Caja Porta-Rata: Aumenta nivel de actividad y tono muscular, sin lograr modificar: piloerección, respuesta pupilar a la luz, secreciones lacrimales, nasales y salivales, reacciones al ruido, a estímulo algésico, a la manipulación y total ausencia de acciones repetitivas.

2. Tablero de Campo Abierto con Agujeros: aumenta el número de cuadrados avanzados, número de posiciones bípedas y total ausencia de crotines.

3. Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico: aumenta head dipping, lo que indicara una mayor capacidad exploratoria propia de una mayor excitación del SNC.

4. Tiempo de Sueño Inducido: aumenta el Tiempo de Latencia para Hipnosis y disminuye el Tiempo de Depresión Total, características de fármacos excitadores del SNC.

Es posible concluir que los alcaloides provenientes de *Schizanthus grahamii* producen excitación del SNC en ratas.

En relación a los resultados obtenidos en este estudio y considerando, la dosis y vía de administración, se valida la hipótesis de este trabajo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ahumada A. 2000. Efecto de la administración del extracto *Hypericum perforatum* sobre la conducta de ratas, en las pruebas de campo abierto con agujeros y tiempo de sueño inducido con pentobarbital sódico. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Alvarez M. 2000. Efecto del extracto liofilizado de *Stachytarpheta cayennensis* sobre el sistema nervioso central en ratas a través de pruebas de comportamiento y tiempo de sueño inducido con pentobarbital sódico. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Alvarez E O, P A Gargiulo, M Ruarte. 1999. Neurofarmacología de los procesos cerebrales de la motivación y la emocionalidad. *Revista neuropsicofarmacología clinica* 4, 5-11.
- Antkowiak B. 2001. How do the General anesthetics work?. *Naturwissenschaften* 88,201-213.
- Archer J. 1973. Test for emotionality in rats and mice. *Anim. Behav* 21: 205.235.
- Booth N, L McDonald. 1988. Farmacología y terapéutica veterinaria. Vol. 1, Acribia, Zaragoza, España.
- Brachet A, O Muñoz, M Gupta, J L Veuthey, P Christen. 1997. Alkaloids of *Erithroxylum lucidum* Stem-Bark. *Phytochemistry* 46, 1439-1442.
- Briones F. 1990. Manual de Medicina Veterinaria Homeopática. Hochstetter Ltda., Santiago, Chile.
- Caulfield M, N Birsall. 1998. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. International union of pharmacology. XVII. *Pharmacological Reviews*. 2, 279-290.
- CETAL, Centro de estudios en tecnologías apropiadas para America Latina. 1993. Plantas medicinales, cuadernos populares. 5ª edición, CETAL, Valparaíso, Chile.
- Conn, M. 1993. Paradigms for the study of behavior. Vol. 14, Academic Press inc., San Diego, California, Estados Unidos de América.
- CYTED. Ciencia y tecnología para el desarrollo. 1998. 1ª Reuniao do proyecto X-4. Obtenção de medicamentos innovadores com atividade anti-hipertensiva e vasodilatadora através de validação orientada de plantas medicinais Iberoamericanas. Recife, Brazil.

- Dawson G, M Triclebank. 1985. Use of the elevated plus maze in the search for the novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacol. Sci* 16, 33-36.
- De la Fuente G, M Reina, O Muñoz, A San Martín, PJ Girault. 1988. Tropane alkaloids from *Schizanthus pinnatus*. *Heterocycles* 27, 1887-1897.
- Domenech JM 1980. Bioestadística. 3ª edición, Herder, Barcelona, España.
- Farga C, J Lastra, A Hoffman. 1988. Plantas medicinales de uso común en Chile. Tomo II, 2ª edición, Paesmi, Santiago, Chile.
- Florez J. 1997. Farmacología humana. 3ª ed., Masson, Barcelona, España.
- Gambaro V, C Labbe, M Castillo. 1983. Angeloyl, tigloyl and seneciroyl oxitropane alkaloids from *Schizanthus hoockeri*. *Phytochemistry*. 22, 1838-1839.
- Grau J 1992. Particularidades de la flora chilena. Flora silvestre de Chile. Palmengarten, Frankfurt, Alemania.
- Griffin W J, D G Lin. 1999. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 53, 623-636.
- Guerra F, M Del C Sánchez. 1984. El libro de medicinas caseras de fray Blas de la Madre de Dios. Cultura hispánica, Madrid, España.
- Guillemain, J M Tetau. 1980. Contribution á l'étude d'un tranquillisant végétal: tilia tomentosa bourgeons. *Cah. Biothérapie* 72, 41-49.
- Hardman J, L Limbird, A Goodman. 2003. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol.1. 10ª edición, McGraw-Hill Interamericana, México.
- Hoffman A, C Farga, J Lastra, E Veghazi. 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile.
- Hollander M, D Wolfe. 1973. Non parametric statistical methods. 2ª edición, Jhon Wiley and Sons, New York.
- Hoshino K, D A Uga, H G De Paula. 2004. The compulsive-like aspect of the head dipping emission in rats with chronic electrolytic lesion in the area of the median raphe nucleus. *Braz J Med Biol Res* 37, 245- 250.
- Hunziker T A. 1979. South American Solanaceae: a sinoptic survey .In: The biology and taxonomy of the solanaceae. Academic press Inc, London, England.

Katzung B G. 1999. Basic and clinical pharmacology. 7th edición, Apleton and Lange, Connecticut, United States of America.

Kay G, K Wesnes. 2005. Pharmacodynamic effects of darifenacin, a muscarinic M₃ selective receptor antagonist for the treatment of overactive bladder, in healthy volunteers. *BJU Internacional* 96 7, 1055-1062.

Lohse J. 2000. Efecto de la administración de extracto de *Hipericum perforatum* sobre la conducta en ratas, en las pruebas de laberinto en cruz elevado y tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Magalhaes H M. 1999. Farmacología Veterinaria. Agropecuárea Ltda., Guaíba, Brasil.

Medina E. 1998. Perspectiva del ministerio de salud sobre plantas medicinales. Presentación al taller "Avances en la investigación de plantas medicinales". XX Reunión anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, 27 de Agosto, Santiago, Chile.

Merino P. 1995. Contribución al conocimiento del efecto tranquilizante de *Avena sativa*, *Escholtzia californica* y *Matricaria chamomilla*, administradas oralmente, en la conducta de ratas sometidas a la Prueba de Campo Abierto. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Montes M T, L Wilkomirsky. 1985. Medicina tradicional chilena. Editorial Universitaria Concepción, Concepción, Chile.

Montes M T, L Wilkomirsky, L. Valenzuela. 1992. Plantas Medicinales. Edición de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile

Muir W, J Hubbell, R Skarda, R Bednarski. 2001. Anestesia Veterinaria. 3^a Edición, Harcourt, Madrid, España.

Muñoz O, 1992. Química de la flora de Chile. *Solanaceae*. DTI. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Naranjo C, U Bustos. 1992. Métodos en farmacología clínica. Métodos de ensayos clínicos de medicamentos. OPS, Washington, Estados Unidos de América

Offermanns S, W Rosenthal. 2004. Encyclopedic reference of molecular pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Olavarria A. 1999. Efecto de la administración de *Passiflora incarnata* y *Passiflora coerulea*, sobre la conducta de ratas sometidas a pruebas de comportamiento. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

- Pascual R, M Catalan, M Fuentealba. 2003. Rasgos de ansiedad y alteraciones neuronales en la corteza prefrontal medial, ocasionadas por experiencias adversas tempranas. *Rev chil neuro-psiquiatr* 41, 201-211.
- Pellow S, P Chopin, S E File, M Briley. 1985. Validation of: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci. Methods* 14, 149 – 167.
- Peterson E. 1980. Noise and laboratory animals. *Lab Anim Sci* 30, 422-439.
- Ponce J. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus pinnatus* sobre el tono muscular de íleon de rata. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Rang H, M Dale. 1995. Farmacología. 2ª edición, Churchill Livingstone, Madrid, España.
- RIVAPLAMED, Rede iberoamericana de validação de plantas medicinais. 1996. I Curso Iberoamericano de Validação de Plantas Medicinais com actividade Sedativa/Tranquilizante. 8-19 Julho, Universidad de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- RIVAPLAMED, Rede iberoamericana de validação de plantas medicinais. 1998. I Curso Iberoamericano de validação de plantas medicinais com actividade no sistema nervoso central. 6-17 de Outubro, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Ruarte M B., A G Orofino, E O Alvarez. 1997. Hippocampal histamine receptors and conflictive exploratio in the rat: studies using the elevated asymmetric plus-maze. *Braz J Med and Biol Res* 30, 1451-1461.
- Ruarte M B, E O Alvarez. 1999. Behavioral profiles displayed by rats in an elevated asymmetric plus-maze: effects of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 32, 99-106.
- San Martin A, J Roviroso, V Gambaro, M Castillo. 1980. Tropane alkaloids from *Schizanthus hookeri*. *Phytochemistry* 19, 1007-2009.
- Sharapin N. 2000. Fundamentos de Tecnologías de Productos Fitoterapéuticos. Publicación del CAB y CYTED.
- Shannon H, S Peters. 1990. A comparison of the effects of cholinergic and dopaminergic agents on scopolamine-induced hyperactivity in mice. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 22, 549-553.
- Siegel S. 1996. Metodología de la investigación. Interamericana McGraw-Hill, New York, Estados Unidos.
- Treit D, J Menard, C Royal. 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus – maze. *Pharmacology biochemistry and behavior* 44, 463- 469.

Villar A M. 1996. Validación científica de las plantas medicinales en primera reunión de coordinación internacional, Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo CYTED. pp 35-41, Antigua Guatemala, Guatemala.

Warfield D. 1973. The study of hearing in animals. Methods of animal experimentation. 4ª edición, London: Academic Press, New York, Estados Unidos de América.

Zar J H. 1974. Biostatistical análisis. Prentice-Hall inc., Englewoods Cliffs, New York, Estados Unidos de América.

8. ANEXOS

Anexo 1: Pauta de Observación programada en Caja Porta-Rata.

PAUTA DE OBSERVACIÓN PROGRAMADA EN CAJA PORTA-RATAS

Examinador						
fecha.						
Serie						
Rata N°						

Puntaje Variables

1 a 3	Lagrimación						
1 a 3	Salivación						
1 a 2	Piloerección						
1 a 3	Nivel de actividad						

1 a 3	Reacción al ruido						
1 a 3	Resp.algésica.						

1 a 3	Respuesta a la manip.						
1 a 3	Tono muscular.						
1 a 2	Respuesta pupilar						

1 a 2	Acciones repetitivas						
-------	----------------------	--	--	--	--	--	--

Rangos

1: Ausente

2: Moderado/Presente

3: Manifiesto

Rata/serie y observaciones.						

Anexo 2: Pauta de Observación Programada de Prueba de Campo Abierto con Agujeros.

Examinador		Fecha:	
Serie:		Peso:	
Dosis Solución		Vol. Adm.	

	de 0 a 5 minutos	de 5 a 10 minutos	total
N°Cuadrados Avanzados			
N°Posiciones Bípedas			
N°Intromisión Agujeros			
N° Crotines			
N° aseos			
Duración Aseos (seg)			

Observaciones:

--

Anexo 3. Prueba de Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico:

	Número de Entradas	Tiempo de permanencia
Plataforma central		
Zona 1		
Zona 2		
Zona 3		
Zona 4		

Anexo 4. Tiempo de Sueño Inducido:

	Inicio	Término	Duración
Latencia para Hipnosis			
Hipnosis			
Narcosis			
Depresión Total			

Anexo 5: tabla 1. Peso de las ratas expresados en gramos, Medias aritméticas \pm E.E. n = 15 ratas

	Control	Schizanthus
Media	219,3	209,5
Error Típico	2,823	2,595

Anexo 6.: tabla 2. **Caja Porta Rata.** Resultados expresados en número de individuos presentes en las variables cualitativas Lagrimación, Salivación, Piloerección, Nivel de actividad y Reacción al ruido, observadas en ratas de los grupos Control y Schizanthus. (Donde 15 es el N para cada grupo)

Variables cualitativas (numero)						
Grupos	Puntaje	Lagrimación	Salivación	Piloerección*	Nivel de actividad	Reacción al ruido
Control	1	15	15	13	13	0
	2	0	0	2	2	14
	3	0	0	0	0	1
Schizanthus	1	15	15	12	3	0
	2	0	0	3	8	14
	3	0	0	0	4	1

Puntaje	Escala de reacción
1	Ausente
2	Moderado/Presente
3	Manifiesto

Anexo 7: tabla 3. **Caja Porta Rata.** Resultado expresados en numero de individuos presentes en las variables cualitativas Respuesta algésica, Manipulación, Tono muscular, Respuesta pupilar y Acciones repetitivas, observadas en ratas de los grupos Control y Schizanthus. (Donde 15 es el N para cada grupo)

Variables cualitativas (numero).						
Grupos	Puntaje	Respuesta algésica	Manipulación	Tono muscular	Respuesta pupilar*	Acciones repetitivas*
Control	1	1	1	0	0	15
	2	14	13	15	15	0
	3	0	1	0	0	0
Schizanthus	1	0	0	0	0	15
	2	15	12	11	15	0
	3	0	3	4	0	0

Puntaje	Escala de reacción
1	Ausente
2	Moderado/Presente
3	Manifiesto

(*) Estas variables sólo fueron clasificadas con ausencia y presencia.

Anexo 8: Tabla 4. Valores de la variable Número de cuadrados avanzados por las ratas en el tablero de campo abierto con agujeros, expresados como medias aritméticas \pm EE. n = 15 ratas.

Tiempo	Control	Schizanthus
0-5 min.	22,0 \pm 3,0	52,0 \pm 3,5
5-10 min.	6,9 \pm 3,5	9,8 \pm 3,4
Min. totales	29,0 \pm 5,7	62,0 \pm 5,4

Anexo 9: Tabla 5. Valores de la variable Número de posiciones bípedas realizadas por las ratas en el tablero de campo abierto con agujeros, expresados como medias aritméticas \pm EE. n = 15 ratas.

Tiempo	Control	Schizanthus
0-5 min.	8,9 \pm 0,9	16,0 \pm 1,5
5-10 min.	1,7 \pm 0,7	1,8 \pm 0,7
Min. totales	11,0 \pm 1,2	18,0 \pm 1,6

Anexo 10: Tabla 6. Valores de la variable Número de intromisiones en los agujeros realizadas por las ratas en el tablero de campo abierto con agujeros, expresados como medias aritméticas \pm EE. n = 15 ratas.

Tiempo	Control	Schizanthus
0-5 min.	0,8 \pm 0,3	1,4 \pm 0,4
5-10 min.	0,5 \pm 0,5	0,9 \pm 0,5
Min. totales	1,3 \pm 0,6	2,3 \pm 0,6

Anexo 11: Tabla 7. Valores de la variable Número de crotones eliminados por las ratas en la superficie del tablero de campo abierto con agujeros, expresados como medias aritméticas \pm EE. n = 15 ratas.

Tiempo	Control	Schizanthus
0-5 min.	0,2 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
5-10 min.	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Min. totales	0,2 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0

Anexo 12: Tabla 8. Valores de la variable Número de aseos realizados por las ratas en el tablero de campo abierto con agujeros, expresados como medias aritméticas \pm EE. n = 15 ratas.

Tiempo	Control	Schizanthus
0-5 min.	1,4 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
5-10 min.	1,3 \pm 0,3	1,2 \pm 0,4
Min. totales	2,7 \pm 0,3	2,5 \pm 0,5

Anexo 13: Tabla 9. Valores de la variable Duración de los aseos expresados en minutos, realizados por las ratas en el tablero de campo abierto con agujeros, expresados como medias aritméticas \pm EE. n = 15 ratas.

Tiempo	Control	Schizanthus
0-5 min.	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
5-10 min.	1,1 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2
Min. totales	1,8 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3

Anexo 14: Tabla 10. Valores de la variable Número de Entradas en las diferentes zonas del Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (LCEA), expresados como medias aritméticas \pm EE.

Zona	Control	Schizanthus
1	0,27 \pm 0,15	0,53 \pm 0,24
2	4,00 \pm 0,50	3,53 \pm 0,59
3	1,07 \pm 0,37	3,13 \pm 0,52
4	2,60 \pm 0,51	3,07 \pm 0,56

Anexo 15: Tabla 11. Valores de la variable tiempo de permanencia en las diferentes zonas del Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (LCEA), expresados en minutos, como medias aritméticas \pm EE.

Zona	Control	Schizanthus
Plataforma Central	1,28 \pm 0,37	1,38 \pm 0,29
1	0,15 \pm 0,11	0,05 \pm 0,02
2	2,67 \pm 0,43	1,67 \pm 0,39
3	0,29 \pm 0,10	1,08 \pm 0,31
4	0,61 \pm 0,21	0,82 \pm 0,26

Anexo 16: Tabla 12, Número de head dipping realizados por las ratas en Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (LCEA), durante los 10 minutos. n = 15 ratas.

	Control	Schizanthus
Media	10,21	15,40
Error típico	1,675	1,841

Anexo 17: Tabla 13, Valores de la prueba de Tiempo de Sueño Inducido, expresados en minutos, como medias aritméticas \pm EE.

Variables	Grupos	
	Control	Schizanthus
Latencia para Hipnosis	5,5 \pm 0,44	8,9 \pm 0,53
Hipnosis	7,0 \pm 0,99	3,8 \pm 0,35
Narcosis	0	0
Depresión Total	7,0 \pm 0,99	3,8 \pm 0,35

Anexo 18: Pauta de Observación programada.

Fecha			
Examinador		Rata N°	
Grupo		Peso	
Dosis de Solución		Vol. Adm.	
Dosis de Pentobarbital		Vol. Adm.	

9. AGRADECIMIENTOS

- Dr. Frederick Ahumada M., profesor patrocinante, por la orientación entregada y la revisión de esta memoria de título.
- Dra. Viviana Bustos, profesora copatrocinante, por las sugerencias realizadas.
- Dr. Orlando Muñoz, profesor colaborador. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Por suministrar el extracto de *Schizanthus grahamii*.
- Dr. Marcos Moreira E. por su ayuda y consejos entregados.
- Sr. Darío Salazar, por su colaboración en el manejo de los animales.
- Paula Mancilla, por su colaboración durante la realización de esta memoria de título.
- Mariela Guerrero M., por su apoyo durante la realización de esta memoria de título.
- Katherine Lara P., por su amabilidad y buena disposición en todo momento.
- A mis padres Federico Jans Y Silvia Luna por su amor incondicional y constante apoyo en toda mi vida.