



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS

Perfil sobre el sistema nervioso central de vitexina-O-glucósido y una fracción rica en flavonoides y saponinas obtenida del extracto de *Passiflora quadrangularis* L

Diana María Chavarro Rodríguez

Química Farmacéutica

Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia
2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS

Perfil sobre el sistema nervioso central de vitexina-O-glucósido y una fracción rica en flavonoides y saponinas obtenida del extracto de *Passiflora quadrangularis L*

Diana María Chavarro Rodríguez

Química Farmacéutica

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Farmacología

Director:

Prof. Mario Francisco Guerrero Pabón

MD. Doctor en Farmacia

Línea de Investigación:

Farmacología experimental de productos naturales sobre el sistema nervioso
central

Grupo de Investigación:

Farmol (Grupo de investigaciones en farmacología molecular)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2022

A quienes siempre les han dicho

“No eres capaz de hacerlo”

No lo crean. Ustedes son capaces

Richard Dübell

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas. A mis padres, quienes siempre han sido el motor que impulsa mis metas y han estado todo el tiempo a mi lado, gracias infinitas. A mi hermana y mi novio, por haberme apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades que se presentaron. Agradezco también a mi director de tesis Mario Francisco Guerrero Pabón, quien con su experiencia, paciencia, conocimiento y motivación me orientó y apoyó durante toda la investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia, que desde el pregrado me ha brindado todas las herramientas y recursos que fueron necesarios para mi formación como profesional. Por último, a COLCIENCIAS, y a la convocatoria 772 de 2018 Jóvenes en salud, por el apoyo económico ofrecido para la realización de este trabajo de investigación.

Perfil sobre el sistema nervioso central de vitexina-O-glucósido y una fracción rica en flavonoides y saponinas obtenida del extracto de *Passiflora quadrangularis* L

Resumen

El objetivo de este estudio fue contribuir con el conocimiento de la actividad sobre el sistema nervioso central de la especie *Passiflora quadrangularis* Linn, evaluando los efectos del metabolito vitexina-2”O-glucósido y una fracción rica en flavonoides y saponinas de esa especie, en vista del interés generado por éstos tras detectar sus efectos cardiovasculares en el modelo murino. Para ello, se utilizaron como modelos experimentales ratones albinos CD-1 con peso entre 25 - 35 g que fueron asignados a los siguientes grupos de tratamiento (n=6): (1) vehículo: agua destilada 78%, glicerina 10%, propilenglicol 10%, polisorbato 80 2%/ 0,1 mL/10 g de peso); Patrones de referencia: (2) Clonazepam (0,2 mg/kg), (3) Imipramina (32 mg/kg), (4-6) Fracción de *Passiflora quadrangularis* Linn insoluble en diclorometano a dosis de 75 mg/kg, 100 mg/kg y 150 mg/kg, (7) Vitexina-2”O-glucósido (20 mg/kg) y (8-10) una fracción de Saponinas de *Passiflora quadrangularis* Linn a dosis de 20 mg/kg, 40 mg/kg y 80 mg/kg. Todos los tratamientos fueron administrados vía oral una hora antes de la realización de cada ensayo. Las pruebas comportamentales utilizadas para la evaluación de los efectos sobre el sistema nervioso central fueron: Prueba de laberinto elevado en cruz y prueba de suelo agujereado (“actividad ansiolítica”), prueba de nado forzado y prueba de suspensión por la cola (“actividad antidepresiva”) y prueba de convulsión inducida por pentilentetrazol (“actividad anticonvulsivante”). Los resultados demostraron que la fracción rica en flavonoides y saponinas de *Passiflora quadrangularis* Linn a dosis de 75 mg/kg aumentó de manera significativa el tiempo y la frecuencia de entrada a los brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz, así como también la frecuencia de exploración en la prueba de suelo agujereado con respecto al control ($p < 0,05$), sugiriendo un efecto tranquilizante. Asimismo, no se presentaron diferencias significativas en el resultado de otras pruebas realizadas, ni con otros tratamientos a las dosis

evaluadas. Por lo tanto, a partir de este estudio es posible plantear que *Passiflora quadrangularis* L. ejercería efectos de tipo ansiolítico posiblemente debidos a metabolitos de tipo saponina y flavonoide, por su parte, Vitexina-2"O-glucósido en cantidades proporcionales a las que se encuentra en el extracto, parece no desempeñar un papel crucial. Se requieren estudios adicionales para establecer con claridad el efecto de tipo ansiolítico de *Passiflora quadrangularis* Linn y el papel que en él desempeñan sus metabolitos flavonoides y saponinas.

Palabras clave: *Passiflora quadrangularis* Linn, ansiolítico, etnofarmacología, flavonoide, saponina.

Central nervous system profile of vitexin-O-glucoside and a flavonoid and saponin-rich fraction obtained from *Passiflora quadrangularis* L. extract.

Abstract

The aim of this study was to contribute to the existing body of knowledge concerning the activity of the species *Passiflora quadrangularis* Linn on central nervous system by assessing the effects of the metabolite Vitexin-2''O-glucoside and a flavonoid-saponin-rich fraction obtained from this plant, considering growing interest in the species after previously reported cardiovascular effects on murine models. For this purpose, CD-1 mice served as research models, whose weight ranged between 25-35g and that were assorted to the following treatment groups (n=6): (1) Control (vehicle: distilled water 78%, glycerin 10%, propylene glycol, polysorbate 80 2% (0,1mL/10g body weight); Reference standards: (2) Clonazepam (0,2mg/kg), (3) Imipramine (32mg/kg), (4-6) Non-soluble-in-dichloromethane fraction of *Passiflora quadrangularis* Linn at doses of 75,100 and 150mg/kg respectively, (7) Vitexin-2''O-glucoside (20mg/kg) and (8-10) a fraction of saponins of *Passiflora quadrangularis* Linn at doses of 20,40 and 80mg/kg respectively. Samples were administered orally one hour before performing any test. The following behavioral tests were conducted to assess any effect on the central nervous system: Elevated plus maze, Hole-board ("anxiolytic activity"), Forced swim and Tail suspension tests ("antidepressant activity") and Pentylentetrazol-induced seizure test ("anticonvulsant activity"). The results showed that the flavonoid-saponin-rich fraction of *Passiflora quadrangularis* Linn at dose of 75mg/kg significantly increased the time and frequency of entry into the open arms, as well as the frequency of exploration at the elevated plus maze and hole-board tests respectively, compared to the control group ($p < 0,05$), thus suggesting a calming effect. Moreover, no other significant differences were observed regarding the findings of the other tests performed or with other treatments at assessed doses. Therefore, based on this study it is reasonable to claim that *Passiflora quadrangularis* Linn would exhibit an anxiolytic-like effect most likely due to saponin and flavonoid-like metabolites, whereas Vitexin-2''O-

glucoside at doses in magnitude like those found on the extract does not appear to play an important role. Further studies are needed to determine and shed light on the anxiolytic effects of *Passiflora quadrangularis* Linn and the extent to which its saponin and flavonoid metabolites might be involved.

Keywords: *Passiflora quadrangularis* Linn, anxiolytic, ethnopharmacology, flavonoid, saponin.

Tabla de contenido

Índice de tablas y gráficas	15
1. Introducción	16
2. Planteamiento del problema	19
3. Justificación	20
4. Antecedentes.....	21
5. Marco conceptual	23
5.1 Ansiedad	23
5.1.1 <i>Fisiopatología de los desórdenes de ansiedad</i>	25
5.2 Fisiopatología de la depresión	28
5.3 Fisiopatología de la epilepsia	29
5.4 Tratamiento Actual	31
5.5 <i>Passiflora quadrangularis Linn</i>	31
5.6 Modelos animales para la evaluación de potenciales ansiolíticos	33
5.6.1 <i>Prueba del eje rodante</i>	34
5.6.3 <i>Laberinto elevado en cruz</i>	34
5.6.4 <i>Prueba de nado forzado</i>	35
5.6.5 <i>Suspensión por la cola</i>	35
5.6.6 <i>Prueba de convulsión inducida por pentilentetrazol</i>	35
5.6.7 <i>Prueba del suelo agujereado</i>	35
6. Objetivos.....	37
6.1 Objetivo General	37
6.2 Objetivos Específicos	37
7. Metodología.....	38
7.1 Animales de laboratorio	38
7.2 Materiales y método de extracción	38
7.2 Diseño experimental y análisis estadístico	39
8. Aspectos éticos, ambientales y legales	43
9. Resultados.....	44
9.1 <i>Prueba del eje rodante</i>	44
9.2 <i>Campo abierto</i>	44

9.3	<i>Laberinto elevado en cruz</i>	45
9.4	<i>Suelo agujereado</i>	47
9.5	<i>Pruebas de Nado Forzado y suspensión por la cola</i>	48
9.6	<i>Pruebas de convulsión inducida por pentilentetrazol</i>	49
10.	Discusión de resultados.....	51
11.	Conclusiones	58
12.	Recomendaciones.....	60
13.	Bibliografía.....	61

Índice de tablas y gráficas

Gráfica No 1. Prevalencia mundial de desórdenes mentales y uso de sustancias, 2017_____	24
Tabla 1. Composición general del extracto etanólico de las hojas de <i>Passiflora quadrangularis</i> L._____	33
Gráfica No. 2. Derivado de quadrangulósido A y B -----	39
Gráfica No. 3. Número de entrecruzamientos en la prueba de campo abierto durante 5 minutos de observación._____	44
Gráfica No. 4. Porcentaje entradas y porcentaje de tiempo en brazos expuestos en prueba de laberinto elevado durante 5 minutos de observación -----	45, 46
Gráfica No. 5. Comparación ratones macho y ratones hembra en prueba de laberinto elevado en cruz durante 5 minutos de observación -----	47
Gráfica No. 6. Número de agujeros explorados en la prueba del suelo agujereado durante 5 minutos de observación._____	48
Gráfica No. 7. Tiempo de inmovilidad en las pruebas de nado forzado y suspensión por la cola durante 5 minutos de observación-----	49
Gráfica No. 8. Resultados de la prueba de convulsión inducida por pentilentetrazol._____	50

1. Introducción

El estudio etnobotánico es una actividad importante en el área de la investigación y desarrollo de fármacos. Datos acerca de nuevas entidades químicas aprobadas como fármacos entre 1982 y 2010, muestran que de un total de 1.355, un 50% provienen directa o indirectamente de fuentes naturales, ya sea porque son moléculas naturales, derivados semisintéticos de las mismas, o porque sus estructuras son miméticas de moléculas naturales y/o contienen un farmacóforo originario de un producto natural (1), como plantas, animales y microorganismos que presentan diversas actividades biológicas (2). Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que alrededor del 80% de la población de los países en desarrollo dependen de los medicamentos modernos que también contienen alrededor del 25% de fármacos derivados de plantas (3). Actualmente se tiene el conocimiento de que estos compuestos, cuya actividad farmacológica es importante, se producen mediante vías metabólicas conocidas como metabolismo secundario (1), del cual se obtienen productos finales de la expresión génica que generalmente no son esenciales para el desarrollo de los seres vivos (2). Muchos de éstos, ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, son utilizados como materias primas de la industria alimentaria, textil, agroquímica, perfumería, cosmética y farmacéutica, ya que algunos poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el ser humano (1).

A lo largo del tiempo, los productos naturales derivados de las plantas se han utilizado como medicinas tradicionales empíricas en forma de remedios, pociones y/o aceites sin ningún conocimiento de los compuestos bioactivos contenidos en el material vegetal, sino teniendo en cuenta únicamente los resultados de cientos de siglos de experimentación del hombre (2), es decir, que el conocimiento etnobotánico está fuertemente enlazado al aspecto cultural y constituye un indicador particular de la población en respuesta a las enfermedades. Sin embargo, investigaciones recientes han logrado determinar que ciertos

metabolitos que constituyen estas medicinas tradicionales poseen actividad farmacológica para el tratamiento de cáncer, enfermedades gastrointestinales, dérmicas, del sistema nervioso central, cardiovasculares y diabetes, entre otras (1). El género *Passiflora*, que comprende alrededor de 500 especies, es la más grande de la familia *Passifloraceae* (familia de la flor de la pasión). Las especies de este género se distribuyen en las regiones templadas y tropicales cálidas del nuevo mundo; son mucho más raras en Asia, Australia y África tropical. Varias especies se cultivan en los trópicos por sus frutos comestibles, siendo *Passiflora edulis Sims* (maracuyá o Granadilla púrpura), la especie más ampliamente cultivada (4). A partir de los extractos obtenidos, ha sido posible reportar la presencia de flavonoides y saponinas (5). Como ocurre con otras especies del género *Passiflora*, las hojas de *Passiflora quadragularis* son usadas en la medicina tradicional como sedante y tranquilizante. Datos neurofarmacológicos reportan que el extracto hidroalcohólico de las hojas de esta especie presenta actividad ansiolítica en ratas evaluadas (5).

La respuesta a la ansiedad es un mecanismo importante por el cual nos adaptamos y respondemos a peligros reales. La desregulación de esta respuesta resulta en un marcado, persistente y excesivo miedo irracional, culminando en una interferencia significativa en la vida (6). La ansiedad es un estado psicológico y patológico caracterizado por un conjunto de síntomas somáticos, emocionales, cognitivos y comportamentales. Aunque puede o no existir estrés psicológico, la ansiedad crea sentimientos de miedo, preocupación y pavor, causando angustias en el funcionamiento diario (7). La ansiedad es un componente importante en una variedad de enfermedades, incluyendo patologías neurológicas y cardiovasculares y parece estar asociado con el envejecimiento, reduciendo significativamente la calidad de vida de las personas. Por estas razones y algunas más que se describirán más adelante, la evaluación de la ansiedad en modelos animales y potenciales tratamientos es de vital importancia (8).

Con base a lo descrito anteriormente, el presente estudio busca contribuir al conocimiento de la actividad ansiolítica del género *Passiflora*, evaluando la

actividad en ratones de laboratorio de una fracción rica en saponinas y flavonoides, la vitexina-2"O-glucósido y una fracción de saponinas obtenidas de las hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn.

2. Planteamiento del problema

En el estudio realizado por Bareño et al (9), se encontró que el extracto presentaba actividad de tipo antihipertensivo y que el mecanismo de acción para ejercer esta actividad es agonista α_2 . Algunos fármacos disponibles en el mercado que tienen este mecanismo de acción presentan tanto actividad vascular como actividad central (sedante, ansiolítica). Esta doble actividad se debe al hecho de que los receptores α_2 pueden encontrarse en primer lugar, de manera presináptica, al ser estimulados, se produce una inhibición de la liberación de noradrenalina y por lo tanto disminución de la presión arterial. En segundo lugar, en el centro del locus ceruleus, por ejemplo, los agonistas α_2 pueden producir sedación, analgesia y efectos eufóricos y bloquear parcialmente los síntomas agudos de abstinencia en usuarios crónicos de opioides (10). Se han realizado algunos estudios para determinar la composición química y la potencial actividad farmacológica de la especie *Passiflora quadrangularis* L. Un estudio reportó actividad ansiolítica del extracto total de esta especie (11), sin embargo, no se han encontrado estudios que determinen cuál de los grupos de metabolitos secundarios que se encuentran en *Passiflora quadrangularis* L. presentan esta actividad ansiolítica ni tampoco se han evaluado metabolitos aislados de esta especie. Adicionalmente, dentro de la revisión bibliográfica realizada se encontraron estudios que evaluaban la actividad ansiolítica y sedante del extracto, mas no se encontraron investigaciones que evalúen otras potenciales actividades farmacológicas sobre el sistema nervioso central como efecto antidepresivo, o anticonvulsivante. Puesto que vitexina-2"O-glucósido es uno de los principales metabolitos identificados en *Passiflora quadrangularis* reportados por la literatura, en este estudio se planteó evaluar el posible efecto de tipo ansiolítico de este compuesto, comparado con el proporcionado por el extracto total y una fracción rica en saponinas aisladas recientemente, con el fin de avanzar en el posible papel como fuente farmacológica sobre el sistema nervioso de *Passiflora quadrangularis* Linn y sus metabolitos activos.

3. Justificación

Colombia es considerada un país privilegiado por ser reconocido como el segundo a nivel mundial en diversidad de especies vegetales, y que al menos 6.000 de estas especies poseen propiedades medicinales. El uso tradicional de plantas medicinales es ampliamente reconocido en los mercados populares, donde plantas silvestres se emplean para diversidad de dolencias (12). Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que en los países en desarrollo el 25% de los medicamentos comercializados por la industria farmacéutica contienen algún fármaco obtenido o derivado de plantas (3).

Aunque estudios previos ya iniciaron con la investigación de la actividad ansiolítica de la especie *Passiflora quadrangularis* Linn, no se conocen las moléculas implicadas en este efecto. La identificación de estos compuestos es importante, ya que al ser aisladas pueden ser evaluadas y convertirse en potencial fármaco dentro de un medicamento para tratar desórdenes mentales. Adicionalmente, no se conocen potenciales actividades farmacológicas adicionales de esta especie sobre el sistema nervioso central.

Al ser los principales componentes de la especie *Passiflora quadrangularis* L., los flavonoides y las saponinas, tal como describe Bareño et al (13), se decidió indagar acerca de la influencia que tenían estos grupos de metabolitos sobre los efectos que se han reportado previamente.

Por último, el uso de modelos animales está bien establecido en el estudio de las bases biológicas de los trastornos psiquiátricos ya que son una herramienta inestimable en el análisis de la multitud de causas (genéticas, ambientales o farmacológicas) que pueden provocar síntomas homólogos a los de pacientes con un trastorno específico (14).

4. Antecedentes

Tal y como fue mencionado anteriormente el uso de las especies de *Passiflora* como plantas medicinales se ha reportado desde siglos atrás, y, actualmente, estas plantas son ampliamente utilizadas en la medicina popular en muchos países, en gran parte como sedantes y ansiolíticos (15), por este motivo, en los últimos años han sido incluidas como objeto de estudio por parte de investigadores alrededor del mundo con el fin de identificar plenamente las propiedades terapéuticas y que presenta y las moléculas implicadas en estos efectos.

Los resultados de la investigación reportados en la literatura se describen desde el año 2007, con el inicio de la evaluación farmacológica del extracto. De Castro y colaboradores evaluaron el extracto hidroalcohólico y acuoso de las hojas de *Passiflora quadrangularis* L. mediante las pruebas de suelo agujereado, laberinto elevado en cruz y campo abierto. Se encontró actividad de tipo ansiolítica para el extracto hidroalcohólico, pero no para el extracto acuoso (11). Posteriormente, con el inicio de la investigación de la composición química, en el año 2012, Sakalem y colaboradores evaluaron la composición fenólica evaluación de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de *Passiflora*. Para el caso de *Passiflora quadrangularis* L. fueron encontradas: Flavonas, saponinas C-O diglicosiladas y glicósidos cianogénicos (16). En el año 2014 Ramaiya y colaboradores reportaron los resultados obtenidos tras la evaluación del contenido total fenólico del extracto de hojas y tallos *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora maliformis*, y *Passiflora edulis*. Para el caso de *Passiflora quadrangularis* Linn el porcentaje de antioxidantes encontrado fue del 9.76% (17). Continuando con la evaluación farmacológica, en el año 2017, Bareño y colaboradores demostraron el efecto antihipertensivo del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn inducida por L-NAME. El estudio fue realizado tanto *in vivo* e *in vitro*. Para el primer caso se utilizaron ratas Wistar a las cuales se les administró el tratamiento durante 7 semanas. Para la evaluación *in vitro*, posterior al sacrificio de los

animales, se obtuvieron los anillos de aorta y se evaluó la respuesta relajante vascular (13). En el año 2018, se reportaron varios estudios que permitieron contribuir con el conocimiento de esta especie. Gazola y Colaboradores luego de la preparación de un extracto etanólico de las hojas de *Passiflora quadrangularis*, caracterizaron los flavonoides obtenidos luego de un fraccionamiento. De esta manera lograron determinar la presencia de vitexina 2"-O-xilósido, vitexina-2"-O-glucósido, orientina-2"-O-xilosido y orientina-2"-O- glucósido (5). Echeverry y colaboradores contribuyeron con la estandarización del extracto de las partes áreas de *Passiflora quadrangularis Linn*. Para ello se optimizó la extracción de flavonoides totales, evaluando variables como relación fármaco-solvente, solventes de extracción y tiempo de extracción, utilizando la Metodología de superficie de respuesta (18) y para complementar la evaluación farmacológica estos mismos autores, evaluaron la actividad de tipo sedante de un extracto acuoso estandarizado de las hojas de *Passiflora quadrangularis Linn* mediante la prueba de hipnosis inducida por éter etílico en ratones Swiss ICR. A partir de este estudio se demostró que el extracto optimizado mejora el efecto sedante en comparación con un extracto previamente evaluado en la prueba de hipnosis inducida por éter etílico (18). Por último, en el año 2019, Porras y Colaboradores desarrollaron una formulación líquida a partir de un extracto hidroalcohólico de hojas de *Passiflora quadrangularis L*. En su primera fase se determinó el perfil del producto, el perfil de calidad del producto y los atributos críticos de calidad. Así, en los ensayos de preformulación se evaluó el efecto de la temperatura, la luz, la concentración de etanol y el tipo de poliol sobre variables respuesta como pH, color, cantidad de precipitado y cuantificación de marcadores. La luz fue la única variable que tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la estabilidad del extracto. La prueba de eficacia antimicrobiana evidenció la capacidad de autopreservación del extracto de *Passiflora quadrangularis* (19).

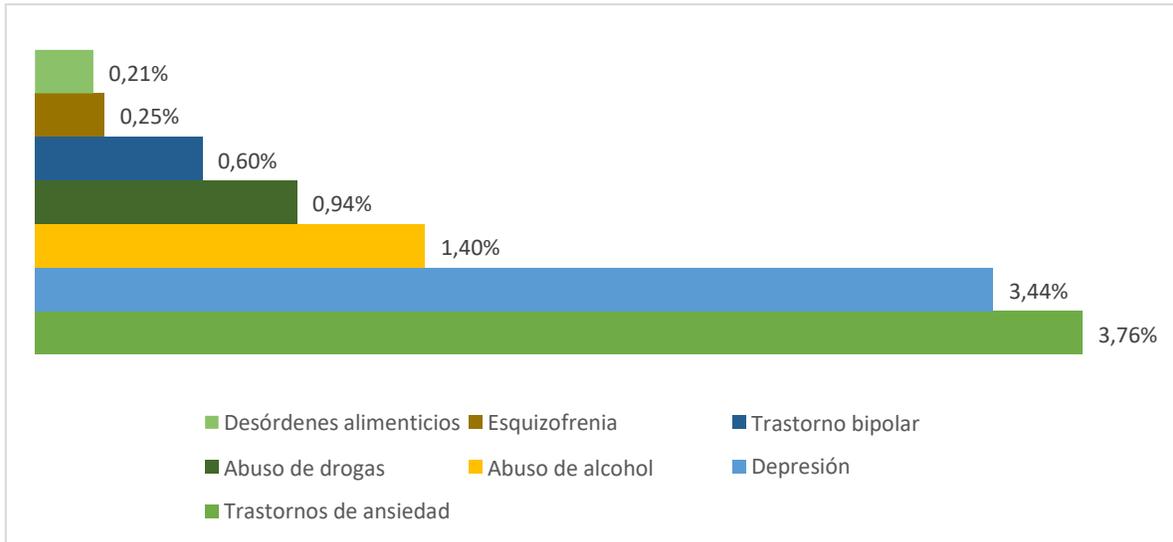
5. Marco conceptual

5.1 Ansiedad

La ansiedad está definida como una anticipación a un daño posterior acompañada de sentimientos desagradables, relacionados con peligro real o imaginario. Se constituye como un estado emocional cuya característica principal es un afecto negativo, con síntomas corporales de tensión y aprehensión de incontabilidad sobre sucesos futuros (8). Los trastornos de ansiedad son los trastornos psiquiátricos más prevalentes. Según las encuestas epidemiológicas, un tercio de la población se ve afectada por un trastorno de ansiedad en algún momento de su vida (20). Según estudios realizados por la OMS, se estima que un 3,8% de la población mundial presentó algún trastorno de ansiedad en el año 2017 (Figura No.1). Su aparición es más común entre las mujeres que los hombres (4,6% comparado con el 2,6% a nivel global) y en la región de las Américas, se estima que un 7,7% de la población femenina sufre de un trastorno de ansiedad (en comparación con los hombres que fue del 3,6%). El número total estimado de personas que vivían con trastornos de ansiedad en el mundo era 284 millones para el año 2017 (21). Se considera relevante el estudio de la salud mental, ya que según una investigación realizada por la OMS y el Banco Mundial, denominado Carga Global de la Enfermedad, se concluyó que los trastornos mentales ocupan cinco de los diez primeros lugares entre todas las enfermedades que causan discapacidad, teniendo en cuenta dos factores, muerte prematura y días vividos con discapacidad. En el caso de Colombia, las razones antes mencionadas son pertinentes, pero se valida aún más cuando se reconoce como telón de fondo la situación de pobreza del país, la violación de los derechos humanos, los desastres naturales y los efectos que ha tenido el conflicto armado de más de 40 años en la salud mental de los colombianos (22).

Gráfica No 1. Prevalencia mundial de desórdenes mentales y uso de sustancias, 2017.

Adaptado de: Saloni Dattani, Hannah Ritchie and Max Roser (2021) - "Mental Health".



Desde una perspectiva clínica, los trastornos de ansiedad son descritos por el manual Diagnostic and Statistical IV en términos de subtipos que se distinguen por la naturaleza del estímulo provocador de ansiedad. Los subtipos más comunes que afectan a los adultos: 1) Fobia específica; 2) trastorno de ansiedad social; 3) trastorno de ansiedad generalizada; 4) trastorno de pánico; y 5) agorafobia (6).

- Fobia específica: La fobia específica es la forma más común de ansiedad y puede manifestarse, por ejemplo, como el miedo a las alturas (acrofobia), el miedo a los espacios cerrados (claustrofobia), el miedo a los gatos (ailurofobia), o el miedo a los perros (cinofobia). La fobia específica se define como un miedo o ansiedad marcada sobre un objeto o situación específico, en el cual el objeto o situación de las fobias casi siempre provocará miedo o ansiedad inmediata y causará una angustia significativa. El miedo o la ansiedad son persistentes y están fuera de proporción con el peligro que la fobia objeto o situación plantea objetivamente. Además, el paciente activamente evita el objeto o la situación (7).

- Fobia social: El trastorno de ansiedad o fobia social es un temor marcado o ansiedad fuera de proporción acerca de una o más situaciones sociales en las que

un individuo está expuesto a un posible escrutinio por parte de otros. Los pacientes con trastorno de ansiedad social temen que su comportamiento o sus síntomas de ansiedad puedan ser juzgados negativamente por quienes los rodean, causando vergüenza o humillación. Por lo tanto, los pacientes evitan estas situaciones sociales que provocan ansiedad (7).

- Trastorno de ansiedad generalizada: Aunque el trastorno de ansiedad generalizada constituye un pequeño porcentaje de los trastornos de ansiedad en la práctica psiquiátrica, en atención primaria en salud, se ha diagnosticado un trastorno de ansiedad generalizada en hasta el 22% de los pacientes que experimentan síntomas de ansiedad. El trastorno de ansiedad generalizada se define como una preocupación excesiva, sobre una serie de eventos o actividades, lo que causa una importante angustia o deterioro de la salud social, ocupacional, u otras áreas importantes de funcionamiento diario. El trastorno de ansiedad generalizada se presenta con síntomas físicos como fatiga, tensión muscular, e inquietud (7).

- Trastorno de pánico: Los ataques de pánico se presentan con una amplia gama de síntomas incluyendo palpitaciones, taquicardia, diaforesis, temblor, asfixia, falta de aire, parestesia, y miedo a perder el control o la muerte. Un ataque es seguido por la preocupación persistente sobre ataques futuros (7).

- Agorafobia: Miedo o ansiedad sobre situaciones en las que la fuga puede ser difícil o la ayuda podría no estar disponible y podría favorecer la aparición de un ataque de pánico (7).

5.1.1 Fisiopatología de los desórdenes de ansiedad

El cuerpo humano intenta mantener la homeostasis en todo momento. Cualquier evento en el medio ambiente que perturbe el equilibrio se define como un factor estresante y el restablecimiento de este equilibrio se realiza mediante adaptaciones fisiológicas que se producen en respuesta al estrés. Por lo tanto, es

importante mencionar que los factores no genéticos, incluyendo las influencias ambientales que ocurren a lo largo de la vida, también pueden contribuir a desarrollar un desorden de ansiedad (23).

Martin y colaboradores describen que los síntomas de los desórdenes de ansiedad son producto en parte por una alteración en el equilibrio de la actividad en los centros emocionales del cerebro y en menor proporción por la alteración en centros cognitivos superiores. Estos últimos, residen en el lóbulo frontal. La corteza frontal prefrontal es responsable de funciones ejecutivas como la planeación, la toma de decisiones, la predicción de consecuencias para comportamientos potenciales, y la comprensión y moderación del comportamiento social. La corteza orbitofrontal, codifica la información, controla los impulsos y regula el estado de ánimo. En un cerebro sano, estas regiones corticales frontales regulan los impulsos, las emociones y el comportamiento mediante el control inhibitorio de las estructuras de procesamiento emocional (24).

Las estructuras cerebrales de procesamiento emocional se conocen como "sistema límbico". La corteza límbica incluye la corteza insular y la corteza cingulada. La corteza límbica integra los componentes sensoriales, afectivos y cognitivos del dolor y procesa la información relativa al estado corporal interno. El hipocampo es otra estructura de sistema límbico que tiene control inhibitorio tónico sobre el sistema hipotalámico de respuesta al estrés y juega un papel en la retroalimentación negativa del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal. El volumen del hipocampo y la neurogénesis en esta estructura han sido implicados en la sensibilidad al estrés y la resiliencia en relación con el humor y los desórdenes de ansiedad. La amígdala, otra estructura del sistema límbico, procesa estímulos externos emocionalmente salientes e inicia la respuesta conductual apropiada. Además, es responsable de la expresión del miedo y la agresión, así como del comportamiento defensivo específico de las especies, y desempeña un papel en la formación y recuperación de memorias emocionales y relacionadas con el miedo. El núcleo central de la amígdala está fuertemente interconectado con las regiones corticales, incluyendo la corteza límbica. También recibe la entrada del hipocampo, del tálamo, y del hipotálamo. Adicionalmente a las regiones

involucradas en la regulación y procesamiento de las emociones, también es importante considerar los neurotransmisores que proporcionan la comunicación entre estas regiones. Un aumento de la actividad en las regiones cerebrales procesadoras de emociones en pacientes que padecen un trastorno de ansiedad puede resultar de una disminución de la señal inhibitoria por el ácido γ -aminobutírico (GABA) o la neurotransmisión excitatoria creciente de glutamato (24).

Las propiedades ansiolíticas de fármacos que actúan principalmente en sistemas monoaminérgicos han implicado serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), norepinefrina y dopamina en la patogenia de los trastornos del estado de ánimo y ansiedad. Los reguladores monoaminérgicos incluyen receptores transmisores; el transportador de monoamina vesicular, que empaqueta estos neurotransmisores en vesículas; la vasopresina, la oxitocina, los transportadores de la recaptación específicos de un transmisor, el transportador de dopamina; la enzima monoamina oxidasa, que degrada serotonina, dopamina y norepinefrina; y la enzima catecolamina-O-metiltransferasa (COMT), que degrada dopamina y norepinefrina. En el sistema nervioso central, los neurotransmisores clásicos a menudo son empaquetados y co-lanzados con neuropéptidos, muchos de los cuales se expresan en regiones límbicas donde pueden influir en los circuitos de estrés y emociones. Los neuropéptidos con enlaces particularmente fuertes a la psicopatología son la colecistoquinina, el Galanin, el neuropéptido Y, la vasopresina, la oxitocina y el factor liberador de corticotropina. La colecistoquinina se encuentra en el sistema gastrointestinal y nervio vago y se localiza centralmente en numerosas regiones límbicas. Galanin se encuentra co-localizado con monoaminas en núcleos de la médula oblonga, influye en el procesamiento del dolor y en el comportamiento de la alimentación. El neuropéptido Y es conocido por sus efectos orexígenos y se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, donde se co-localiza con norepinefrina en el hipotálamo, hipocampo, y amígdala. En el centro, la oxitocina regula el comportamiento reproductivo, maternal y de filiación. La vasopresina regula la homeostasis, pero

también se puede co-localizar con la oxitocina para influenciar el comportamiento filial (24).

El factor liberador de corticotropina en las neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico es el secretagogo primario para el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal en respuesta a un estímulo amenazador. La vasopresina sinergiza con el factor liberador de corticotropina en la activación del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal. Allí, el factor liberador de corticotropina se libera del núcleo paraventricular y actúa sobre los receptores de la hipófisis anterior para provocar la producción y liberación de la hormona adrenocorticotrópica, que activa la producción y liberación de glucocorticoides de la corteza suprarrenal. En los seres humanos, el principal esteroide de estrés es el cortisol. La actividad del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal está regulada por numerosas otras estructuras del sistema límbico, incluyendo la amígdala, que mejora la actividad de este eje, y el hipocampo, que suprime su activación (24).

5.2 Fisiopatología de la depresión

La depresión, tal como la describe la OMS, es un trastorno del estado de ánimo caracterizado por síntomas específicos que incluyen tristeza, pérdida de interés, anhedonia, falta de apetito, sentimientos de culpa, baja autoestima o autoestima, trastornos del sueño, sensación de cansancio y falta de concentración. Se cree que algunos tipos de depresión, como el trastorno distímico y el trastorno de depresión mayor, están influenciados por factores genéticos y biológicos, mientras que otros tipos, como la depresión menor, pueden considerarse como respuestas a eventos importantes de la vida (25).

A pesar de que la investigación continua en neurofisiología y neuropsiquiatría aumenta la comprensión de la fisiopatología de la depresión, los mecanismos precisos por los cuales se desarrolla la depresión están incompletos, y esto se debe en parte a que la depresión es un trastorno heterogéneo con un complejo fenómeno y múltiples etiologías potenciales. Una comprensión holística del proceso fisiopatológico de una enfermedad es crucial si se quiere lograr un

tratamiento y una resolución efectivos de la enfermedad. En el caso de la depresión, la escasa comprensión de la fisiopatología de la enfermedad ayuda a explicar por qué algunas intervenciones no consiguen los resultados deseados. El fracaso de la mayoría de las formas de terapias para la depresión subraya la enorme carga de enfermedad y el impacto negativo de la depresión en las vidas individuales, la comunidad y la economía en general, y también aboga por una comprensión más integral del proceso fisiopatológico de la enfermedad (25).

Los mecanismos actualmente reconocidos que apuntan a explicar la fisiopatología de la depresión incluyen; la hipótesis de la amina biogénica (disponibilidad reducida de estos importantes neurotransmisores de monoaminas que da como resultado una disminución de la neurotransmisión y un deterioro del rendimiento cognitivo que puede conducir a la depresión), la desregulación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA) y los factores genéticos y ambientales. Otros posibles contribuyentes incluyen la neurogénesis, el aumento de la secreción de citocinas inflamatorias (factores inmunológicos), niveles elevados de factor liberador de corticotropina (CRF) y anomalías de los sistemas de segundos mensajeros. El mayor desafío para comprender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la depresión es que no existe una única hipótesis que explique todos los aspectos de los signos y síntomas de la depresión, y lo más probable es que la depresión involucre múltiples mecanismos de enfermedad interrelacionados que se manifiestan como una constelación de signos y síntomas (25).

5.3 Fisiopatología de la epilepsia

La epilepsia se ha reconocido desde el año 4000 A.C. (OMS, 2017). Es un trastorno neurológico no contagioso que resulta de explosiones de descargas eléctricas excesivas en un grupo de células cerebrales. La OMS describe la epilepsia como una patología crónica caracterizada por una recurrencia de convulsiones, que son una serie de movimientos involuntarios de una parte del cuerpo (parcial) o de todo el cuerpo (generalizado), con o sin pérdida de conciencia (26).

Las señales eléctricas de las neuronas se producen de dos formas: el potencial de acción, que se propaga a lo largo del axón de la neurona de forma centrífuga, permitiendo el transporte de la señal dentro de la neurona, y la transmisión sináptica, que permite la transmisión de la señal entre neuronas y se realiza mediante impulsos químicos que se convierten en señales eléctricas. La membrana neuronal es semipermeable a diferentes iones que transportan cargas eléctricas (26).

Cuando la terminal presináptica del axón es estimulada por un potencial de acción se produce la entrada de Ca^{2+} en la célula, y ésta desencadena la liberación de neurotransmisores. Los neurotransmisores se acoplan a los receptores de membrana postsinápticos. Este proceso da lugar a potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores y la suma de estos potenciales sincronizados da lugar a la actividad eléctrica que se registra en el EEG. Glutamato y aspartato son los principales neurotransmisores excitadores del sistema nervioso central, mientras que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibidor (27).

La epileptogénesis es el proceso mediante el cual un grupo de neuronas, generalmente de la corteza cerebral, desarrolla una excitabilidad exagerada y alcanza un estado en el que puede producir crisis epilépticas de forma espontánea. En la fisiopatología de las epilepsias están involucrados dos tipos de fenómenos: el inicio de descargas repetitivas anómalas por un grupo de neuronas y la propagación de estas descargas a otras neuronas vecinas y distantes. La epileptogenicidad está causada por alteraciones en poblaciones neuronales que dan lugar a la disminución de sus propiedades inhibitoras o al aumento de las excitadoras. La aparición de crisis epilépticas puede estar relacionadas con alteraciones en la neurotransmisión (en relación con alteraciones estructurales de los receptores de los neurotransmisores y de los canales iónicos), cambios en el medio iónico, alteraciones en la morfología de las neuronas y en los circuitos neuronales. Además de factores ambientales, en la patogenia de la epilepsia influyen también factores genéticos, que modulan la mayor susceptibilidad de cada individuo a padecer crisis recurrentes. Se supone que son numerosos los genes

que influyen en la excitabilidad neuronal, y en la mayoría de las situaciones cada paciente desarrolla epilepsia de un tipo o severidad en función de la acción combinada de varios genes. Sin embargo, además se han identificado numerosas epilepsias que están determinadas por la presencia de mutaciones en un solo gen. Muchas de ellas están relacionadas con mutaciones en genes codificadores de subunidades de canales iónicos o con receptores de membrana. En otras ocasiones son genes implicados en los procesos de migración neuronal que tiene lugar durante la formación embrionaria de la corteza cerebral (27).

5.4 Tratamiento Actual

Tal y como se mencionó anteriormente, el tratamiento de los trastornos de ansiedad está íntimamente ligado a los neurotransmisores que se cree que median los síntomas de ansiedad. Las benzodiazepinas se unen a Receptores GABA-A, mejorando los efectos de GABA. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) aumentan la disponibilidad de la serotonina al inhibir su recaptación presináptica, y los inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (IRSN) actúan de manera similar que los anteriores. Los inhibidores de la monoamina oxidasa (IMAO) inhiben la monoamina oxidasa, aumentando la disponibilidad de neurotransmisores como la serotonina, norepinefrina y dopamina. Los antidepresivos tricíclicos inhiben la recaptación presináptica la serotonina y la norepinefrina, pero también antagonizan los receptores de histamina y los receptores muscarínicos de acetilcolina (7).

La conclusión clínica de que la ansiedad y la depresión pueden ser catalogadas como comorbilidades ha llevado a la observación de que los ISRS después de las observaciones sobre la eficacia de los antidepresivos tricíclicos en la ansiedad. De hecho, hoy los ISRS son una terapia de primera línea para muchos trastornos de ansiedad (6).

5.5 *Passiflora quadrangularis* Linn

El género *Passiflora*, que comprende alrededor de 500 especies, es la más grande de la familia *Passifloraceae* (Familia de la flor de la pasión). Las especies de este género se distribuyen en las regiones templadas y tropicales cálidas del nuevo mundo; son mucho más raros en Asia, Australia y África tropical. Varias especies se cultivan en los trópicos por sus frutos comestibles, siendo los más ampliamente cultivados *Passiflora edulis Sims* (maracuyá o Granadilla púrpura) (4). La morfología universal del género de los *Passifloras* se ha revisado extensivamente. Las plantas del género *Passiflora* son arbustos y hierbas, en su mayoría trepadoras. Hojas alternas, a veces simples, enteras, lobuladas o palmadas, a veces compuestas, imparipinada El tallo puede ser herbáceo o leñoso, raramente arborescente. Las flores, bisexuales o unisexuales se abren alrededor del mediodía que es generalmente la hora más caliente del día hasta el final de la tarde, y durante este periodo, los polinizadores, al recoger el néctar, transfieren el polen de una flor a otra. El descubrimiento de semillas de varios miles de años de *Passiflora* en sitios arqueológicos en Virginia y Norteamérica proporciona evidencias fuertes del uso prehistórico de los frutos de *Passiflora*, y varias especies de *Passiflora* se han utilizado extensivamente en el sistema tradicional de la terapéutica en muchos países (4) (28). El uso de las especies de *Passiflora* como plantas medicinales comenzó en el siglo XVII en Europa debido a su propiedad sedante, actualmente, las especies de *Passiflora* son ampliamente utilizadas en la medicina popular en muchos países, en gran parte como sedantes y ansiolíticos (29).

Passiflora quadrangularis se produce principalmente en zonas tropicales de Suramérica, como Colombia, Ecuador, y el norte y el noreste de Brasil (5). Los informes sobre la composición química describen flavonoides y saponinas como componentes principales (5) (30). Los compuestos mayoritarios identificados en esta especie luego de una marcha fitoquímica se muestran en la tabla No. 1 (13).

Tabla No 1. Composición general del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora quadrangularis* L.

Metabolito secundario	Presencia en Hojas (%)
Saponinas	80
Flavonoides	14
Alcaloides	1,5

Adaptado de: Bareño, Lesly L., Puebla, Pilar, et al. (2017). *Passiflora quadrangularis* L. prevents experimental hypertension and vascular remodelling in rats exposed to nitric oxide deficit. *Vitae*, 24(3), 186-195. (13)

5.6 Modelos animales para la evaluación de potenciales ansiolíticos

Los modelos animales son experimentales desarrolladas en una especie con el propósito de estudiar fenómenos que ocurren en otra especie, y estos modelos pueden ser válidos si tienen la misma estructura que el comportamiento o patología humana. El uso de modelos animales está bien establecido en el estudio de las bases biológicas de los trastornos psiquiátricos. A pesar de las dificultades tradicionales en la aceptación de modelos animales para la psicopatología, derivado del argumento de que no hay evidencia para concluir que lo que ocurre en el cerebro del animal equivale a lo que ocurre en el cerebro de un ser humano, estos modelos son una herramienta inestimable en el análisis de la multitud de causas (genéticas, ambientales o farmacológicas) que pueden provocar síntomas homólogos a los de pacientes con un trastorno específico. Los modelos de comportamiento de roedores han sido optimizados en rata durante el siglo pasado. Sin embargo, el ratón es mucho más estudiado como un organismo genético, ya que es más fácil de alojar, se reproduce más rápidamente, y su genoma se ha caracterizado más completamente. El campo conductual ha tratado de adaptar las pruebas desarrolladas en la rata al ratón. La mayoría de los modelos implican la exposición de sujetos a los estímulos externos (por ejemplo, luz brillante, depredador) o internos (por ejemplo, estados del fármaco) que se supone que son capaces de inducir la ansiedad en los animales (14). Las únicas variables que se pueden observar y medir en los animales son las respuestas fisiológicas y de comportamiento que se generan cuando están expuestos a situaciones potencialmente ansiogénicas bajo condiciones de laboratorio controladas (31).

Existen variedad de modelos de evaluación de actividad farmacológica, los que se utilizaron en el presente estudio se describen a continuación.

5.6.1 Prueba del eje rodante

El eje rodante consiste en un cilindro de 2,5 centímetros de diámetro, que gira a una velocidad de 12 revoluciones por minuto. El eje está a una altura de 25 centímetros de una plataforma en la que los animales al caer detienen un contador de tiempo que permite registrar sus tiempos individuales sobre el eje (32). Esta prueba evaluó la posible alteración motora que pudieran ejercer los compuestos por efecto de relajación muscular o sedación, y esto da un valor significativo como prueba de neurotoxicidad o para determinar el estado basal de los roedores candidatos a participar en un ensayo neurofarmacológico (33).

5.6.2 Prueba de Campo abierto

Se utilizó un campo abierto para evaluar el efecto sobre la actividad locomotora. Se utiliza un campo abierto para evaluar actividad exploratoria, con dimensiones 30 x 30 x 15 cm y con 9 cuadros en su base de igual tamaño. Se tuvo en cuenta la tendencia natural del animal a explorar, a pesar del conflicto provocado por el ambiente nuevo. Se cuantificó el número de entrecruzamientos (con las cuatro patas entre las divisiones del campo) (34).

5.6.3 Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz consiste en una plataforma de 25 cm de altura, formada por dos brazos abiertos opuestos de 30 x 5 cm y dos brazos cerrados de 30 x 5 x 5 cm, con un área central denominada zona neutra de 5 x 5 cm. En esta prueba, se dispuso al animal en la zona neutral, mirando hacia uno de los brazos cerrados y se observó durante 5 min, registrando el número de veces que ingresó a las zonas abiertas y a las zonas cerradas, al igual que el tiempo de permanencia

en ellas. Un aumento en la frecuencia y el tiempo de permanencia en las zonas abiertas sugiere efecto de ansiolítico (34).

5.6.4 Prueba de nado forzado

Para desarrollar esta prueba, se utilizó un tanque de 70 centímetros de alto por 40 centímetros de diámetro, lleno de agua (35°C) hasta un límite de aproximadamente 55 centímetros. Posteriormente, se grabó la conducta durante un período de cinco minutos. Para el análisis de los efectos en la prueba de nado forzado, se utilizó la variable “tiempo de inmovilidad” en la que se contabilizó el tiempo total de inmovilidad (suma total de los segundos en los que el animal sólo realiza los movimientos necesarios para mantenerse a flote) durante la sesión (34).

5.6.5 Suspensión por la cola

Se suspendió a cada ratón por la cola por un periodo de 5 minutos y se registró el tiempo de inmovilidad para cada animal y la latencia para la aparición de tal comportamiento, teniendo en cuenta que debieron ser pretratados con una hora de antelación (34).

5.6.6 Prueba de convulsión inducida por pentilentetrazol

Los animales se dosificaron por vía oral con los tratamientos. 30 minutos después, les fue administrado pentilentetrazol (70 mg/kg, vía subcutánea, previos ensayos preliminares) y se observaron durante un periodo de 30 mn para determinar la presencia o ausencia de convulsiones clónicas en la cabeza, tronco o extremidades con una duración mínima de cinco segundos (35).

5.6.7 Prueba del suelo agujereado

Para el ensayo se utilizó una plataforma de madera (30 x 30 cm) a una altura de 10 cm con 9 orificios de 2 cm de diámetro, equidistantes. El ensayo se inició colocando el ratón en el centro de la plataforma agujereada y se evaluó la actividad durante 5 minutos, registrando el número de veces que el animal espió los orificios. Se considera “espiar” cuando el ratón introduce la cabeza dentro de los agujeros hasta el nivel de las orejas. El aumento en el número de exploraciones sugiere un menor estado de ansiedad y una mayor actividad exploratoria (36).

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Contribuir con la construcción de conocimiento de la actividad sobre el sistema nervioso central de la fracción rica en flavonoides y saponinas obtenida del extracto etanólico de *Passiflora quadrangularis L.* y la vitexina-O-glucósido, un flavonoide que se ha encontrado en esta especie, a partir de modelos experimentales con ratones de laboratorio en las instalaciones del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

6.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la actividad de tipo ansiolítica de la fracción rica en flavonoides y saponinas obtenida del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora quadrangularis L.* en ratones de laboratorio CD-1.
2. Evaluar la actividad de tipo ansiolítica en ratones de laboratorio CD-1, de vitexina-O-glucósido presente en *P. quadrangularis L.*
3. Determinar posibles efectos de tipo sedante, antidepresivo y anticonvulsivante del de la fracción rica en flavonoides y saponinas obtenida del extracto etanólico de *Passiflora quadrangularis L.* y la vitexina-O-glucósido.

7. Metodología

7.1 Animales de laboratorio

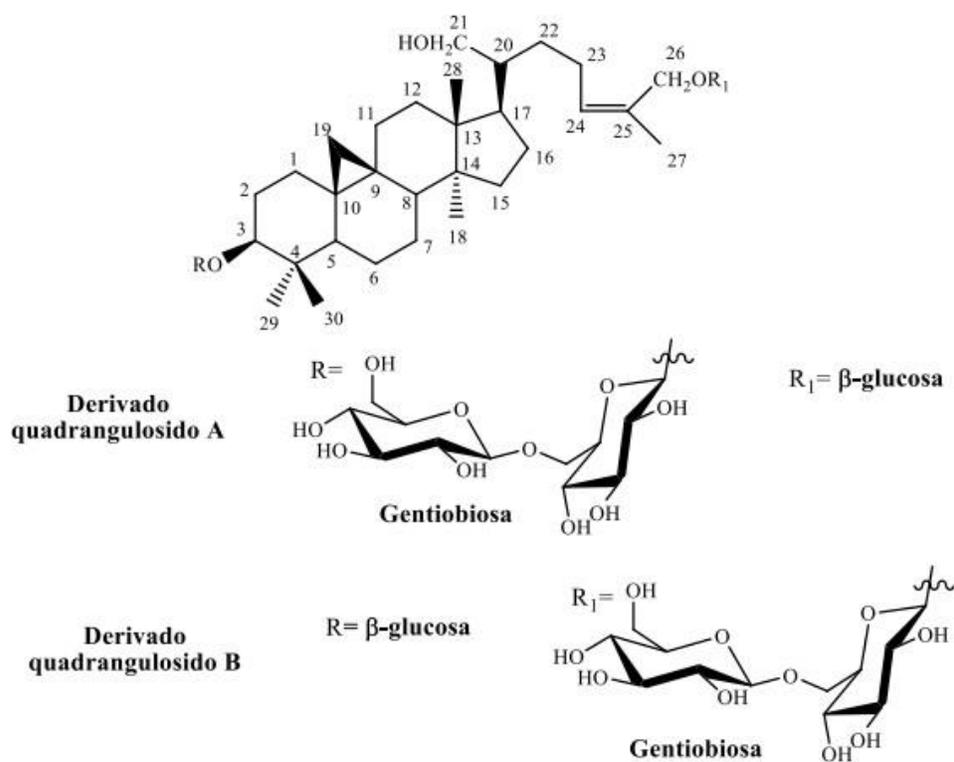
Los experimentos fueron realizados en ratones macho y hembra CD-1 procedentes del Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), con ciclos de 12 h luz/oscuridad y consumo de agua y alimento a libre demanda, excepto en el día de la prueba cuando se les retiró el alimento seis horas antes de la experimentación. Se utilizaron los protocolos avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y ajustados a las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia (37).

7.2 Materiales y método de extracción.

La vitexina-2"O-glucósido (Santa Cruz Animal Health), el clonazepam y la imipramina se adquirieron de manera comercial. La obtención de la fracción rica en flavonoides y saponinas y la subfracción de saponinas de *Passiflora quadrangularis* Linn fue obtenida por Bareño et al (9) en el año 2020 de la siguiente manera: El material vegetal se cosechó en Guayabo, Caldas, Colombia en mayo de 2016. Posteriormente, se realizó una extracción con etanol 96%, y el extracto obtenido se desceró con metanol. Posteriormente, se realizaron lavados consecutivos con diclorometano para finalmente obtener una fracción soluble en diclorometano y una fracción insoluble en diclorometano, siendo esta última la evaluada en este estudio. Seguidamente, para cada fracción obtenida se realizó una separación mediante consecutivas cromatografías en columna, continuando con espectrometría de masas, con el fin de identificar los

compuestos presentes en la especie. La subfracción de saponinas fue obtenida tras la realización de la cromatografía de la fracción insoluble en diclorometano (9).

Tras la realización de la cromatografía se identificaron saponinas cicloartanólicas y flavonoides en la fracción rica en saponinas y flavonoides, mientras que en la subfracción de saponinas se identificaron los derivados de quadrangulósido A y B (Gráfica No. 2) (9).



Gráfica No. 2. Estructura química derivados quadrangulósido A y B (9).

7.2 Diseño experimental y análisis estadístico

La vitexina-2''O-glucósido se evaluó a dosis de 20 mg/kg de acuerdo con el rendimiento obtenido de este flavonoide a partir de extractos hidroalcohólicos en otros estudios realizados previamente, en el que Echeverry y colaboradores luego de realizar una optimización de la

obtención de flavonoides totales en la especie, encontró que el 20% de los flavonoides aislados correspondían a vitexina-2"O-glucósido (18). La fracción rica en flavonoides y saponinas se evaluó a dosis de 75, 100 y 150 mg/kg, posología basada en el estudio *in vivo* sobre actividad cardiovascular realizado por Bareño y colaboradores (36). Adicionalmente, se evaluó la subfracción de saponinas obtenida por Bareño et al (9), a dosis de 20, 40 y 80 mg/kg. Se incluyó como control negativo un grupo con el vehículo en el que se prepararon las fracciones, correspondiente a la mezcla: glicerina 10%, propilenglicol 10%, polisorbato 2% y agua destilada 78%. También se incluyó, en cada prueba, un grupo control positivo, correspondiente al patrón de referencia, cuya dosis se determinó en ensayos preliminares, así: (1) Para las pruebas de laberinto elevado en cruz, campo abierto y convulsión inducida por pentilentetrazol se utilizó clonazepam a dosis de 0,2 mg/kg, vía oral (p.o); (2) Para las pruebas de nado forzado y suspensión por la cola se utilizó imipramina a dosis de 32 mg/kg p.o.

De acuerdo con trabajos previos con extractos de plantas medicinales en el Departamento de Farmacia (Grupo Farmol), y luego de la estandarización de la metodología, los tratamientos se administraron durante 3 días consecutivos previos a los días de la prueba, a grupos de 6 ratones asignando aleatoriamente los tratamientos. Los animales se mantuvieron previamente bajo condiciones experimentales en el bioterio, alojados en cajas durante dos semanas.

Los experimentos se realizaron en forma secuencial, en el horario de la tarde y con los mismos grupos de animales para optimizar el uso de éstos, de la siguiente manera:

Día 0: Antes de la administración de los tratamientos: Prueba del eje rodante (valoración la función motora gruesa del animal en condiciones

basales) y prueba del campo abierto (para efectuar una cuantificación de la actividad basal locomotora de los animales y a partir de allí organizar grupos homogéneos de los mismos).

Día 1– Día 3: Administración de los tratamientos (0.1 mL/10 g de peso),

Día 3: Prueba del eje rodante (valoración la función motora gruesa del animal tras la administración de los tratamientos).

Día 3: Prueba de laberinto en cruz: En este experimento, los tratamientos de vitexina-2"O-glucósido y las dosis de la fracción fracción rica en flavonoides y saponinas de *Passiflora quadrangularis Linn* (fase 1) fueron evaluados en ratones hembra CD-1, mientras que las dosis de la subfracción de saponinas (fase 2) fueron evaluadas en ratones macho CD-1. En uno y otro caso se incluyeron los grupos control negativo (vehículo) y control positivo (patrón, agente de referencia).

Día 4: Prueba de suelo agujereado

Día 5: Prueba de nado forzado.

Día 6: Prueba de suspensión por la cola

Día 7: Prueba de convulsión por pentilentetrazol

Cada prueba se efectuó una hora después de haberse aplicado la última administración de cada tratamiento.

Los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media, excepto en las pruebas de convulsión, en los que la variable de observación es de tipo categórica: "todo o nada" (presencia o ausencia de convulsión). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía,

seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. Cuando el ANOVA arrojó que los supuestos paramétricos de homogeneidad de varianzas (prueba F) y de distribución normal (prueba de Bartlett) no se cumplieron, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida de la prueba de diferencias de Dunn. Se estableció un nivel de significancia de 95% ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Los datos obtenidos se analizaron con los programas Microsoft *Excel de Microsoft 365*® y *Graphpad 7*®.

8. Aspectos éticos, ambientales y legales

De acuerdo con los principios establecidos en la ley 84 de 1989 de la República de Colombia y en la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993 y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el artículo 87 de la resolución. El presente estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- Los animales de investigación fueron proporcionados por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, la cual es una institución válida, autorizada e idónea para tal acción.
- Las instalaciones destinadas al alojamiento de los animales de experimentación están diseñadas para cubrir las necesidades de los sujetos de experimentación, investigador y personal que interviene en el cuidado diario.
- El investigador nunca dejó de tratar a los animales como seres sensibles y se consideró como un imperativo ético el cuidado y uso apropiado y evitar o minimizar el discomfort angustia y dolor.
- El investigador presumió que procedimientos que causarían dolor en seres humanos también causen dolor en otras especies vertebradas, aun cuando todavía falta mucho por saber sobre la percepción del dolor de los animales.
- Los animales seleccionados para la experimentación son una especie y calidad apropiada y utilizar el mínimo número requerido (las 3R de Russel y Burch) para obtener resultados científicamente válidos.
- Al final del experimento, o cuando fuera adecuado durante el mismo, los animales que pudieran sufrir dolor crónico o severo, angustia, discomfort o invalidez que no pueda ser mitigada, fueron sacrificados sin dolor.
- Esta propuesta de investigación fue aprobada por el comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá con el acta 03-2019.

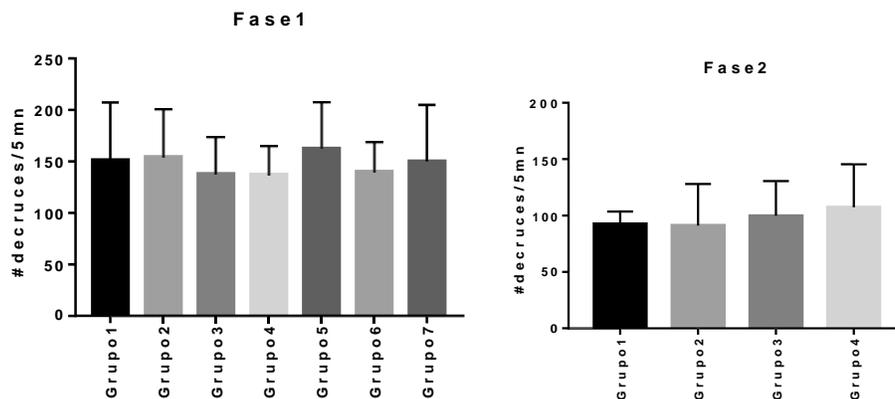
9. Resultados

9.1 Prueba del eje rodante

Esta prueba se realizó pre y post-exposición a los tratamientos evaluados. En ambos casos, todos los animales lograron permanecer al menos 1 minuto sobre el eje horizontal del equipo. Por lo tanto, es posible decir que, a las dosis evaluadas, los tratamientos no alteran la actividad motora de los animales.

9.2 Campo abierto

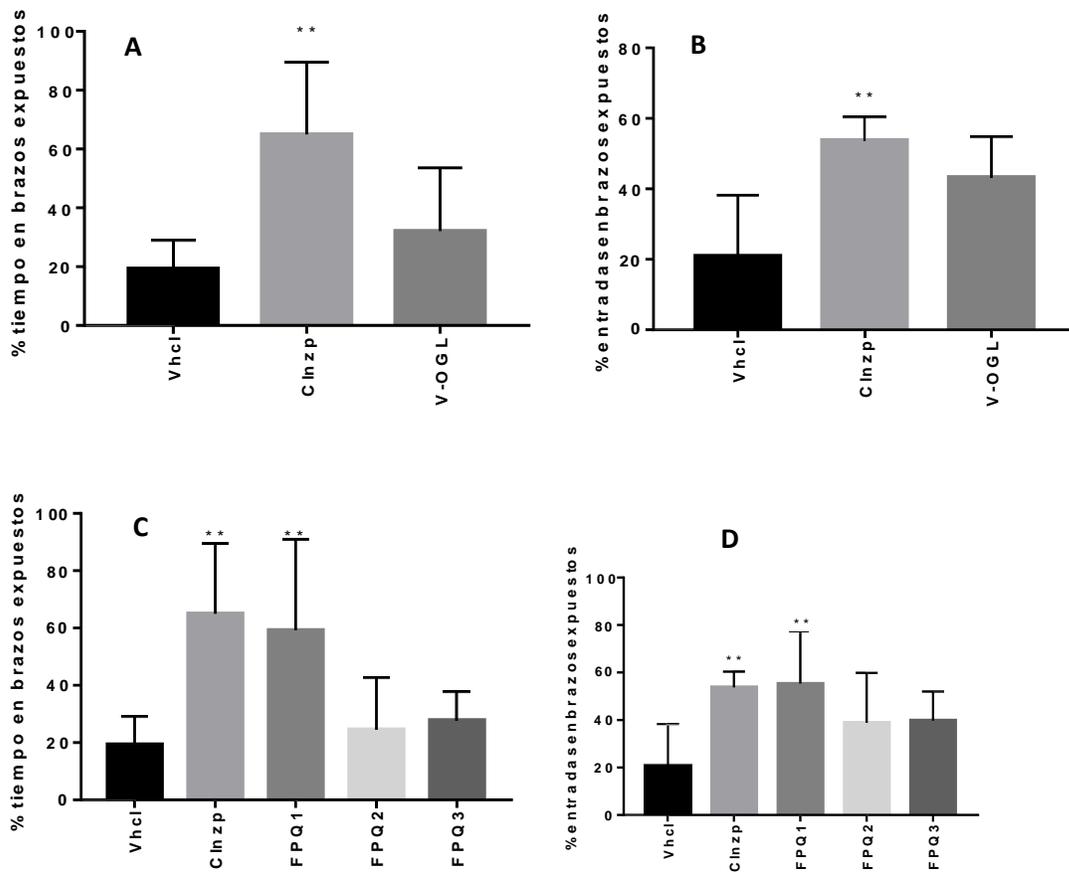
La prueba de campo abierto se utilizó para organizar los grupos de tratamiento. La gráfica No.3 muestra que no hubo diferencia significativa entre los grupos de tratamiento en las dos fases de este experimento, por lo que los grupos de animales pueden considerarse homogéneos y así se lograron obtener resultados más confiables.

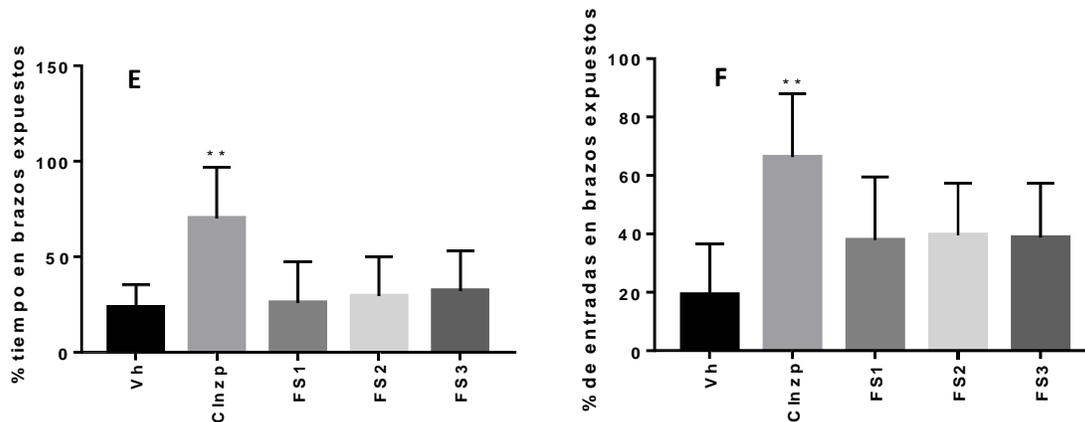


Gráfica No. 3. Número de cruces en la prueba de campo abierto durante 5 minutos de observación para los diferentes grupos. Prueba realizada previo a la administración de tratamientos. La determinación de la diferencia significativa se determinó mediante el test de Tukey. Cada barra representa el promedio + e. m. s., * $p \leq 0,05$ con respecto al vehículo (n= 6).

9.3 Laberinto elevado en cruz

Clonazepam, un fármaco conocido por su actividad ansiolítica, aumentó significativamente el porcentaje de entrada en los brazos abiertos y el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz, cuando se comparó con el grupo control ($p < 0,05$). El grupo de animales tratados con la fracción insoluble en diclorometano de *Passiflora quadrangularis* a dosis de 75 mg/kg también aumentó significativamente el porcentaje de entrada en los brazos abiertos y el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos cuando se comparó con el grupo control. Los demás tratamientos evaluados no presentaron diferencia significativa al realizar la comparación estadística con el grupo control (Gráfica No.3).

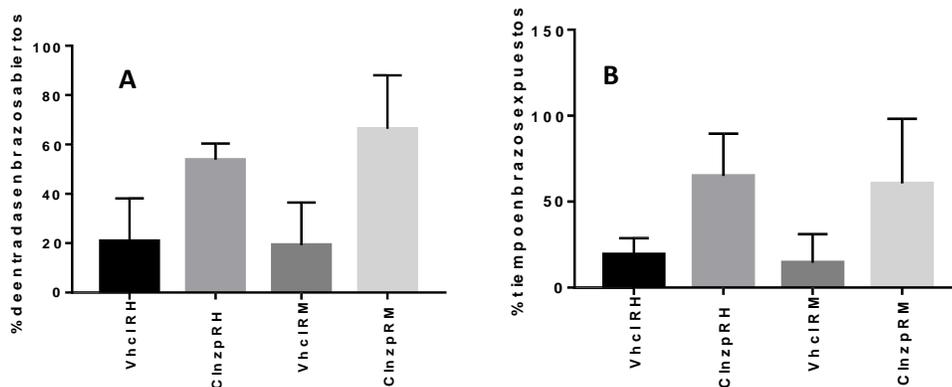




Gráfica No.4. Efecto de clonazepam (0,2 mg/kg), la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 75, 100 y 150 mg/kg, vitexina-2"-O-glucósido (20 mg/kg), una subfracción de saponinas de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 20 mg/kg, 40 mg/kg y 80 mg/kg, y vehículo: agua destilada, polietilenglicol, glicerina y polisorbato 80), en el tiempo de acceso a las zonas expuestas (**A,C,E**) y en la frecuencia de entrada (**B,D,F**) del laberinto elevado en cruz, habiéndose administrado una hora los tratamientos via p.o (0,1 mL/10 g de peso). Cada barra representa el promedio + e. m. s., *p ≤ 0,05 con respecto al vehículo (n = 6 por grupo). Vhcl: Vehículo; Clnzp: Clonazepam; FPQ1: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis L.* a dosis de 75 mg/kg, FPQ2: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 100 mg/kg, FPQ3: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 150 mg/kg; V-OGL; Vitexina-2"O-glucósido 20 mg/kg; FS1: Subfracción de saponinas dosis 20 mg/kg; FS2: Subfracción de saponinas dosis 40 mg/kg; FS3: Subfracción de saponinas dosis 80 mg/kg.

Como se mencionó anteriormente, los experimentos con vitexina-2"O-glucósido, las diferentes dosis de la fracción rica en saponinas y flavonoides y la subfracción de saponinas a dosis de 20 mg/kg de *Passiflora quadrangularis Linn*. se realizaron con ratones hembra CD-1 (fase 1), mientras que las dosis de 40 y 80 mg/kg de la subfracción de saponinas de *Passiflora quadrangularis Linn*, se realizaron con ratones macho CD-1 (fase 2); Por lo anterior, se realizó una comparación entre el grupo vehículo de la fase 1 versus el grupo vehículo de la fase 2 así como también una comparación entre el grupo clonazepam de la fase 1 versus

el grupo clonazepam de la fase 2 en donde para ninguno de los dos casos se encontraron diferencias significativas para los grupos de tratamiento comparados (Gráfica No. 5).

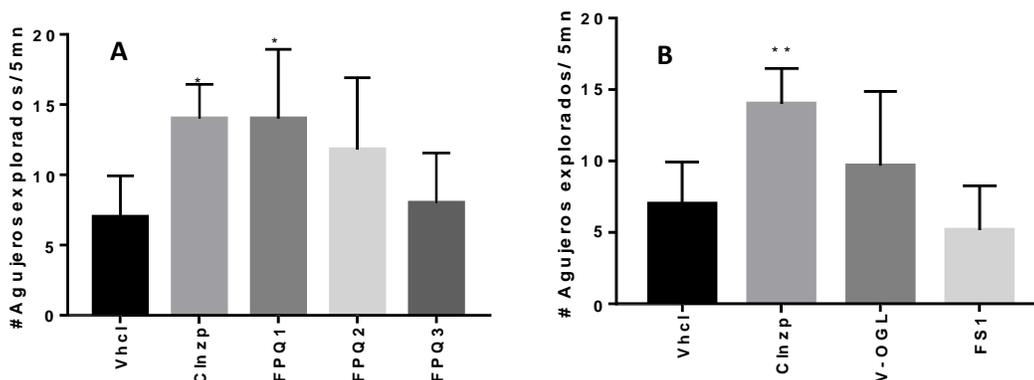


Gráfica No.5. Comparación del control negativo y el clonazepam (0,2 mg/kg) en la frecuencia de entrada **(A)** y el tiempo de acceso a las zonas expuestas **(B)** del laberinto elevado en cruz, experimento realizado en ratones hembra y ratones macho habiéndose administrado previamente una hora los tratamientos via p.o (0,1 mL/10 g de peso). Cada barra representa el promedio + e. m. s., * $p \leq 0,05$ con respecto al vehículo (n = 6 por grupo). Vhcl RM: Vehículo administrado en ratones macho; Vhcl RH: Vehículo administrado en ratones hembra (fase 1) Clnzp RH: Clonazepam administrado en ratones hembra; Clnzp RM: Clonazepam administrado en ratones macho (fase 2).

9.4 Suelo agujereado

Similar a la prueba anterior, clonazepam y la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis* Linn a dosis de 75 mg/kg, aumentaron significativamente el número de agujeros explorados por los animales cuando se comparó con el grupo control ($p < 0,05$). Los demás tratamientos evaluados no

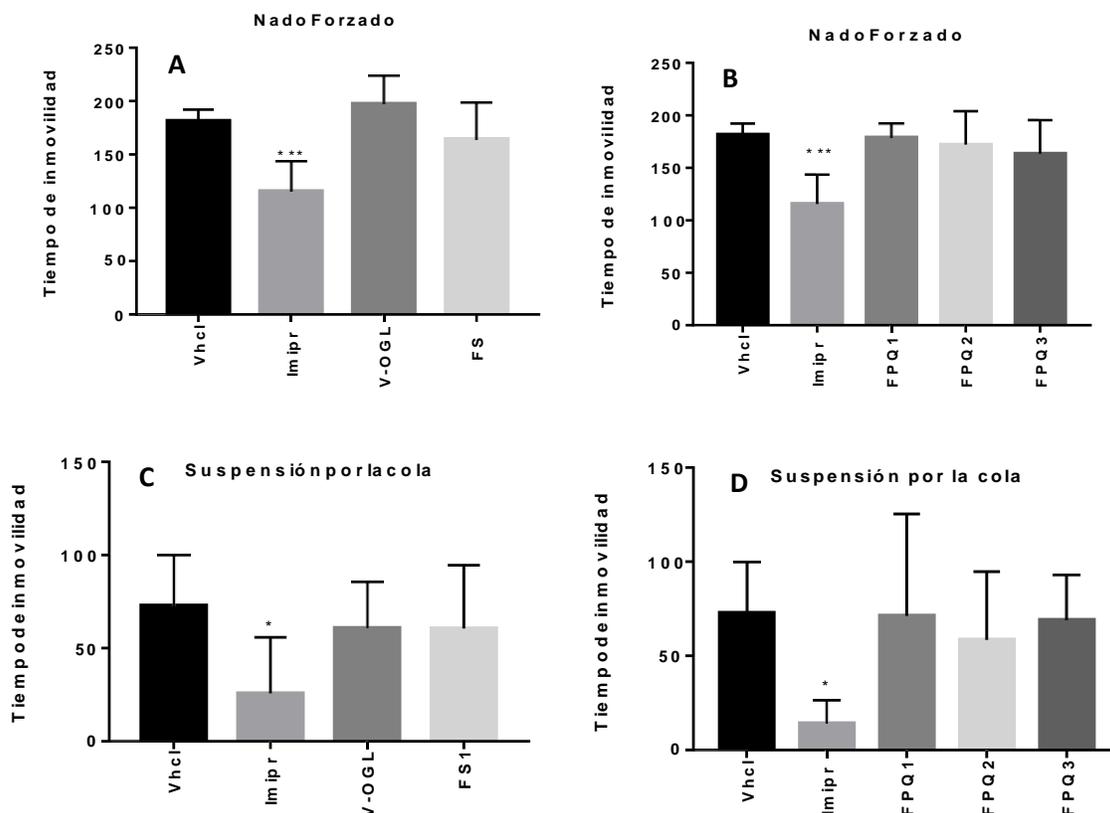
presentaron diferencia significativa al realizar la comparación con el grupo control



Gráfica No.6. Efecto de clonazepam (0,2 mg/kg), vitexina -2-O-glucósido (20 mg/kg), una subfracción de saponinas de *Passiflora quadrangularis Linn* (A) a dosis de 20 mg/kg y la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 75, 100 y 150 mg/kg (B), y el vehículo (agua destilada, polietilenglicol, glicerina y polisorbato 80), en el número de agujeros explorados por los animales de cada grupo, habiéndose administrado una hora antes los tratamientos por vía p.o (0,1 mL/10 g de peso). Cada barra representa el promedio + e. m. s., * $p \leq 0,05$ con respecto al vehículo (n = 6 por grupo). Vhcl: Vehículo; Clnzp: Clonazepam; FPQ1: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 75 mg/kg, FPQ2: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 100 mg/kg, FPQ3: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *P.quadrangularis Linn* a dosis de 150 mg/kg; V-OGL; Vitexina-2"O-glucósido 20 mg/kg; FS1: Subfracción de saponinas dosis 20 mg/kg.

9.5 Pruebas de Nado Forzado y suspensión por la cola

Los animales tratados con imipramina (32 mg/kg, p.o.), un antidepresivo muy conocido, disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad al realizar la comparación con el vehículo. Por el contrario, la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn*, la vitexina-2"O-glucósido y la subfracción de saponinas no mostraron diferencias significativas en comparación con el vehículo (Gráfica No. 7).

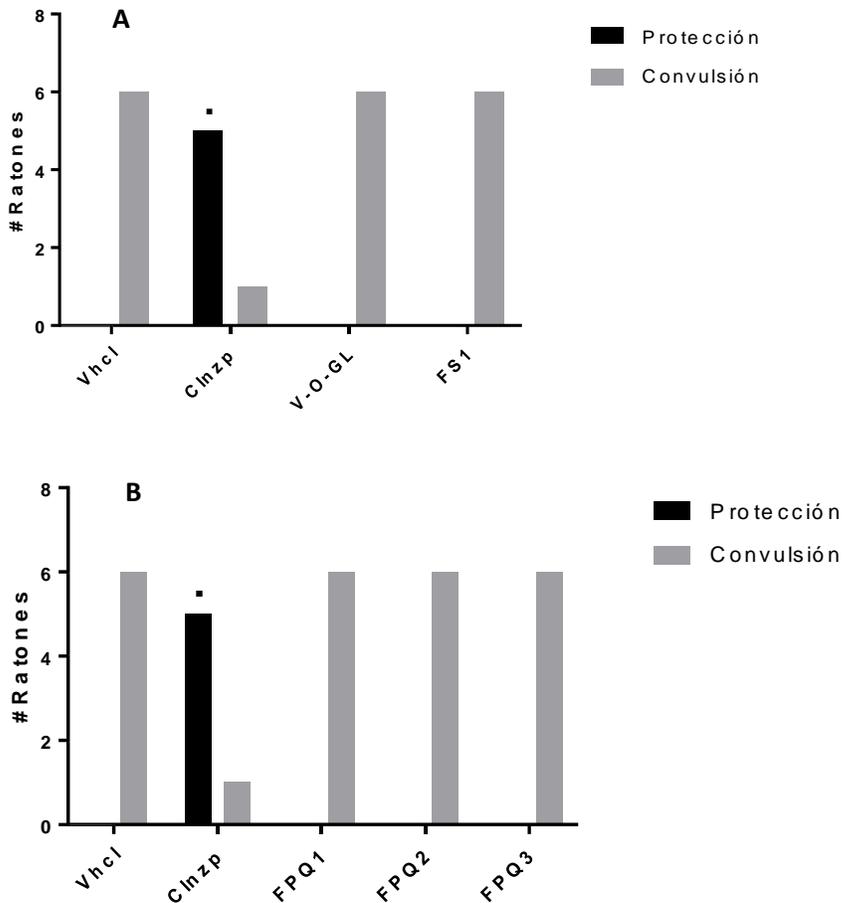


Gráfica No.7. Tiempo de inmovilidad en los modelos de nado forzado (**A, B**) y suspensión por la cola (**C,D**) para los tratamientos de imipramina (32 mg/kg), la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora. quadrangularis Linn* a dosis de 75, 100 y 150 mg/kg, vitexina-2"O-glucósido (20 mg/kg), una subfracción de saponinas de *P. quadrangularis Linn* a dosis de 20 mg/kg, y el vehículo (agua destilada, polietilenglicol, glicerina y polisorbato 80), habiéndose administrado una hora antes los tratamientos vía p.o (0,1 mL/10 g de peso). Cada barra representa el promedio + e. m. s., *p ≤ 0,05 con respecto al vehículo (n = 6 por grupo). Vhcl: Vehículo; Imipr: Imipramina; FPQ1: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis L.* a dosis de 75 mg/kg, FPQ2: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis L.* a dosis de 100 mg/kg, FPQ3: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis L.* a dosis de 150 mg/kg; V-OGL; Vitexina-2"O-glucósido 20 mg/kg; FS1: Subfracción de saponinas dosis 20 mg/kg.

9.6 Pruebas de convulsión inducida por pentilentetrazol

En la gráfica No.6 se observa que el patrón clonazepam utilizado en esta prueba confirmó una alta protección. El efecto de la fracción rica en saponinas y flavonoides del extracto de *Passiflora quadrangularis Linn*, la vitexina-2-O-

glucósido y la subfracción de saponinas del extracto de esta especie, en cambio, no difirió del vehículo.



Gráfica No. 8. Protección frente a la convulsión inducida por pentilentetrazol de los tratamientos clonazepam (0,2 mg/kg), vitexina-2''O-glucósido (20 mg/kg), una subfracción de saponinas aislada de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 20 mg/kg (A) y la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 75, 100 y 150 mg/kg (B) y el vehículo (agua destilada, polietilenglicol, glicerina y polisorbato 80), habiéndose administrados una hora antes los tratamientos por vía p.o (0,1 mL/10 g de peso). La barra representa el promedio + e. m. s., *p ≤ 0,05 con respecto al vehículo (n = 6 por grupo). Vhcl: Vehículo; Clnzp: Clonazepam; FPQ1: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis L.* a dosis de 75 mg/kg, FPQ2: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 100 mg/kg, FPQ3: Fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis Linn* a dosis de 150 mg/kg; V-OGL; Vitexina-2''O-glucósido 20 mg/kg; FS1: Subfracción de saponinas a dosis 20 mg/kg.

10. Discusión de resultados

Estudios previos han demostrado la actividad de tipo sedante de diferentes especies del género *Passiflora*. Específicamente para *Passiflora quadrangularis*, se han reportado resultados que evidencian este efecto en los extractos acuoso e hidroalcohólico de la especie, tras la administración vía oral en la prueba de hipnosis inducida por éter etílico (5, 11,38). Por lo anterior, este estudio se enfocó en determinar otros efectos sobre el sistema nervioso central tras la administración vía oral de una fracción de *Passiflora quadrangularis* Linn rica en saponinas y flavonoides obtenida de un estudio previo realizado por Bareño L. (9). Se decidió evaluar esta fracción que contenía solamente flavonoides y saponinas, ya que, al ser los componentes mayoritarios de la especie, podrían ser los que ejercieran los efectos farmacológicos reportados en la literatura.

En primer lugar, los flavonoides desempeñan un papel importante en el crecimiento y el estrés oxidativo. Son un gran grupo de compuestos polifenólicos que tienen estructura de benzopirona. Estudios con otras especies pertenecientes a la familia Passifloraceae han descrito efectos ansiolíticos tras la administración de extractos de estas plantas y el mecanismo de acción más aceptado es la unión con el receptor GABA (39). Las benzodiazepinas, fármacos que se encuentran dentro del gran abanico de posibilidades de tratamiento actual de la ansiedad, se unen al receptor GABA mediando esta patología. Experimentos en animales transgénicos (ratones), tanto *knock-in* como *knock-out*, mostraron que existen diferentes subtipos de receptores GABA que pueden estar conformados por: Subunidades $\alpha 1$ que median la sedación y sirven como blanco para acciones hipnóticas y sedantes; subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ que median la ansiolisis, y subunidades $\alpha 5$ que están asociados con la memoria, y se ha descrito que la 6-hidroxiavone actúa como un modulador alostérico positivo y exhibe una preferencia significativa por las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en comparación con los receptores que contienen $\alpha 1$ y $\alpha 5$ expresados en las células HEK 293T (39).

Por otro lado, teniendo en cuenta que el estrés oxidativo está asociado con el avance de la depresión, estudios realizados previamente han concluido que los flavonoides pueden ayudar a reducir los síntomas de la depresión, debido a sus grandes propiedades antioxidantes (40). En cuanto a la actividad anticonvulsivante, se ha descrito que la administración vía oral de la flavona wogonina, aislada de *Scutellaria baicalensis*, previno las convulsiones inducidas por pentilentetrazol sin producir efectos sedantes o miorelajantes (41).

El otro grupo de metabolitos secundarios que se encuentran presentes en la fracción de *Passiflora quadrangularis* Linn evaluada son las saponinas. Estos compuestos generalmente cuentan con un anillo terpenoide o esteroidal, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfílico (42). Se ha descrito que las saponinas poseen una amplia gama de actividades biológicas, que incluyen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, sobre el comportamiento cognitivo, adaptogénicas y analgésicas. Adicionalmente, los efectos de las saponinas sobre las enfermedades y lesiones del sistema nervioso se han descrito en la literatura más claramente. Los principales mecanismos que se han asociado con estos efectos neurobiológicos son: Capacidad antioxidante de las moléculas que disminuyen el estrés oxidativo en líneas neuronales; modulación de neurotransmisores como glutamato, GABA y acetilcolina; inhibición de la apoptosis y la cascada caspasa, disminuyendo la pérdida de neuronas dopaminérgicas y el deterioro del comportamiento (43).

Las moléculas identificadas por Bareño y colaboradores (9) en la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis* Linn fueron en su mayoría saponinas cicloartanólicas, y específicamente derivados de quadrangulósido (gráfica No. 2). Mahato y colaboradores (44) realizaron una revisión de las estructuras y posibles efectos farmacológicos que se habían descrito previamente para estas moléculas. Dentro de las actividades biológicas identificadas para estos compuestos se encuentran la capacidad de controlar los niveles de colesterol en sangre. Por otra parte, se han encontrado estudios que describen la actividad

antimicrobiana de estas moléculas, específicamente contra hongos, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*. Adicionalmente, se han encontrado efectos antiinflamatorios al disminuir las concentraciones de histamina y prostaglandina E₂ (44).

A pesar de que no se encontró información sobre las propiedades sobre el sistema nervioso central del quadrangulósido. En la literatura se ha descrito que las saponinas de cicloartano aisladas del género *Astragalus*, exhibieron una variedad de propiedades biológicas, que incluyen cardiotónicas, analgésicas, sedantes, hepatoprotectoras, antivirales y actividades inmunoestimulantes (45). Por lo tanto, se podría pensar que el quadrangulósido puede actuar como sedante y/o analgésico (45).

Con el fin de evaluar los posibles efectos de estas moléculas sobre el sistema nervioso central, se realizaron diferentes pruebas entre las que se encuentra, la prueba del laberinto elevado en cruz, la cual se basa en respuestas espontáneas de la conducta del ratón, utilizando estímulos naturales tales como el miedo a los espacios abiertos y miedo de caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha (34). En este estudio se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al vehículo en los parámetros de frecuencia y tiempo de acceso a las zonas abiertas tras la administración de la dosis de 75mg/kg, un resultado característico de tratamientos ansiolíticos. Comportamientos similares fueron encontrados mediante la prueba de suelo agujerado, en donde se evidenció un aumento en el número de exploraciones de la fracción rica en saponinas y flavonoides de *Passiflora quadrangularis* Linn a dosis de 75 mg/kg con respecto al grupo vehículo, mostrando de igual manera las posibles propiedades ansiolíticas de *Passiflora quadrangularis* Linn.

Sin embargo, al evaluar la fracción a dosis de 100 mg/kg y 150 mg/kg, no se encontraron diferencias significativas con respecto al vehículo tras la realización del análisis estadístico, lo que podría llevar a pensar que el comportamiento de los efectos producidos no depende de la dosis. Tanto en la Gráfica No.4 como en la

gráfica No. 6 se puede evidenciar una curva dosis-respuesta de tipo J invertida. Estos resultados pueden ser explicados por el modelo de hormesis (38), caracterizado por Calabrese y colaboradores como la estimulación con dosis bajas (46). El concepto de hormesis ha generado un interés considerable, ya que la ocurrencia de respuestas de dosis horméticas en estudios de plantas se ha observado desde el año 1907. Adicionalmente, el estudio previo de Gazola y colaboradores. En donde se evaluó la actividad sedante de la apigenina, un flavonoide encontrado en *Passiflora quadrangularis Linn*, se evidenciaron resultados en donde se demostraba la actividad de tipo sedante en la prueba de hipnosis inducida por éter etílico que pueden ser explicados también por este modelo (38). Otros estudios sugieren una estrategia que puede explicar numerosos casos de estas relaciones dosis-respuesta. Un solo agonista puede unirse a dos subtipos de receptores, uno de los cuales activa una vía estimulante mientras que el otro activa una inhibidora. El subtipo de receptor con la mayor afinidad por el agonista normalmente tendría menos receptores (es decir, menor capacidad) y los efectos de activación de su ruta dominan a dosis más bajas. Por el contrario, el segundo subtipo de receptor tendría menor afinidad por el agonista, mayor capacidad (es decir, más receptores) y se volvería dominante a concentraciones más altas (47).

A pesar de que los resultados de vitexina-2"O-glucósido no se diferenciaron de manera significativa del vehículo cuando se realizó la estadística de los datos, se puede observar una tendencia al aumento del porcentaje de entradas en los brazos abiertos (Gráfica No. 4B) y en el número de exploraciones de agujeros (Gráfica No 6B). Adicionalmente, la subfracción de saponinas no exhibió propiedades ansiolíticas a las dosis evaluadas, al ser elegida las dosis de vitexina-2"O-glucósido y la subfracción de saponinas a partir de la cantidad relativa del flavonoide en el extracto total (18) y teniendo en cuenta la curva dosis-respuesta obtenida para la fracción de *Passiflora quadrangularis Linn*, estudios posteriores podrían llevarse a cabo ampliando el número de dosis evaluadas, tanto dosis menores como mayores, esperando encontrar el rango donde se evidencie el efecto ansiolítico. Es importante mencionar que los flavonoides generalmente se

encuentran en las plantas como flavonoides O-glicósidos, en los cuales uno o más grupos hidroxilos del núcleo del flavonoide están unidos a azúcares. La glicosilación de los flavonoides trae consigo que estos sean menos reactivos y más solubles en agua (48). La variación en la glicosilación de las moléculas puede dar lugar a compuestos con mayor o menor actividad, y al tener en este extracto moléculas con variación en la glicosilación, podría pensarse también un cambio en la afinidad por los receptores y por lo tanto una diferencia en las propiedades neurofarmarmacológicas que se observan.

A pesar de que se han descrito propiedades antidepresivas y anticonvulsivantes en estos grupos de metabolitos, los resultados en las pruebas de nado forzado, suspensión por la cola y convulsión inducida por pentilentetrazol no mostraron diferencias significativas con respecto al vehículo ($p < 0,05$) en comparación con los patrones de referencia. Sin embargo, pruebas posteriores podría realizarse con protocolo de administración sostenida que mejore la sensibilidad de la respuesta con dosis (35), y un rango más amplio de dosis.

Por otro lado, los resultados significativamente diferentes en las pruebas de laberinto en cruz y elevado y suelo agujereado a dosis de 75 mg/kg y no a dosis de 100 mg/kg y 150 mg/kg, soportan el planteamiento realizado por Bareño y colaboradores acerca del mecanismo de acción de tipo agonistas alfa-2 (49), comportamiento similar al observado tras la administración de clonidina a dosis bajas, en donde se observan efectos antihipertensivos, sedantes y ansiolíticos, pero no a dosis altas, donde se evidencian efectos vasoconstrictores y, por lo tanto hipertensivos (50).

Es necesario mencionar que este estudio preliminar sobre el efecto sobre el sistema nervioso central del extracto de *Passiflora quadrangularis* Linn. tiene algunas limitaciones. En primer lugar, aunque los resultados de las pruebas realizadas pueden sugerir de manera preliminar que el extracto disminuye los niveles de ansiedad en ratones, esta patología no es fácil de describir y conectar con el comportamiento humano observable, y es por tanto un desafío "vincular la sintomatología compleja y mal entendida en humanos con comportamientos

observables en animales” (8). Debido a esto, se hace necesario ampliar el análisis estudios en seres humanos para poder correlacionar los resultados aquí expuestos y obtener conclusiones más acertadas. En segundo lugar, y el alto costo de la vitexina-2”O-glucósido impidió realizar experimentos con dosis adicionales de este compuesto. Paralelamente, la baja disponibilidad de animales de ambos sexos en el contexto de la pandemia de COVID-19 no permitió realizar todos los experimentos tanto con ratones macho como con ratones hembra. Teniendo en cuenta lo anterior, es importante mencionar, que existen diferentes factores que pueden influir en la respuesta de las pruebas realizadas. Factores internos como genéticos, sexo, edad y peso de los animales, y factores externos como, estímulos sensoriales, densidad en jaula, temperatura, humedad y manipulación (8). Sin embargo, con el fin de disminuir estos sesgos, las pruebas realizadas tuvieron un control positivo y negativo que ayudan a validar y dar confiabilidad a los resultados. Dentro de los factores internos, es necesario tener en cuenta el sexo como una variable que puede influir en los resultados que se encuentren en los estudios que se realicen (51). En la presente investigación se realizaron una serie de ensayos tanto con ratones macho como ratones hembra, con el fin de obtener la mejor estandarización de los patrones de referencia que se iban a utilizar como comparadores de los tratamientos obtenidos de *Passiflora quadrangularis* Linn., adicional a lo relacionado con los animales, los investigadores masculinos y femeninos pueden tener diferentes interacciones y actitudes hacia los animales machos o hembras y obtener efectos contrastantes en esos animales. De ahí que el sexo, el género y la interacción influyen en los hallazgos y producen diferencias importantes como las respuestas específicas del sexo a los medicamentos y las reacciones adversas a los medicamentos relacionadas (51). Aunque la inclusión de machos y hembras en este tipo de experimentos puede incrementar la variabilidad y dispersión en la respuesta evaluada, es necesario incluir los dos sexos en la experimentación, no sólo para optimizar el uso del animal de laboratorio, sino para considerar el eventual diferencial efecto del sexo en la prueba neurofarmacológica. Los ensayos realizados en este estudio no permitieron detectar diferencias sustanciales en la

respuesta entre machos y hembras al evaluar el efecto de tipo ansiolítico (Gráfica No. 5), sin embargo, es importante tenerlo en cuenta en posteriores estudios.

11. Conclusiones

La fracción rica en saponinas y flavonoides obtenida del extracto etanólico de *Passiflora quadrangularis* Linn mostró efectos de tipo ansiolítico en ratones de laboratorio.

El efecto de tipo ansiolítico se observó únicamente a la dosis más baja evaluada (75 mg/kg), evidenciando un efecto no dependiente de la dosis.

No se evidenciaron efectos de tipo ansiolítico con la vitexina-2"O-glucósido y la subfracción de saponinas, lo que podría sugerir un sinergismo de los compuestos del extracto de *Passiflora quadrangularis* Linn. Sin embargo, no es posible descartar efectos de tipo ansiolítico con vitexina-2"O-glucósido, dado que sólo se evaluó la dosis de 20 mg/kg en la cual se observa una tendencia que requiere verificación con estudios posteriores.

No se lograron demostrar efectos similares a los antidepresivos y anticonvulsivantes con la fracción y los compuestos aislados de *Passiflora quadrangularis* Linn.

Ninguno de los tratamientos evaluados indujo incoordinación motora, descartando efectos neurotóxicos de la especie *Passiflora quadrangularis* Linn.

Aunque la subfracción de saponinas no haya presentado actividad de tipo ansiolítica, no se descarta que componentes de saponinas no pertenecientes a esta fracción ejerzan efectos de tipo central.

No se descartan mecanismos análogos a los de agentes tipo α -2, relacionando los resultados previos de actividad antihipertensiva del extracto de *Passiflora quadrangularis* Linn, el efecto vasoconstrictor del extracto y la fracción rica en

saponinas de estudios previos (9) y, con este trabajo, resultados de tipo ansiolítico en la fracción rica en flavonoides y saponinas.

12. Recomendaciones

Con el fin de seguir aportando al conocimiento de la especie *Passiflora quadrangularis* Linn, a partir de los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda complementar los estudios para poder profundizar en las moléculas que presentan los efectos reportados de *Passiflora quadrangularis* Linn, así como también confirmar los mecanismos por los cuales ejercen estas actividades, por ejemplo, podría confirmarse o descartarse el mecanismo agonista α_2 con antagonistas α como yohimbina, así como también realizar pruebas receptor-ligando para determinar mecanismos de acción y tipo de unión al receptor.

Como se mencionó previamente, los resultados con vitexina-2"O-glucósido exhibieron una tendencia de tipo ansiolítica en las pruebas realizadas, por lo que, es importante evaluar dosis adicionales de este compuesto, con el fin determinar la actividad que ejerce la molécula en modelos animales.

Por otro lado, al no evidenciar actividades de tipo ansiolítica, antidepresiva ni anticonvulsivante en la subfracción de saponinas, sería interesante evaluar una subfracción diferente de saponinas obtenida de la fracción insoluble de *Passiflora quadrangularis* Linn, con el fin de identificar las moléculas que presentaron el efecto ansiolítico evidenciado en este estudio.

13. Bibliografía

1. Cañigüeral, Salvador. (2013). Medicamentos a base de plantas: el reto de la calidad y la Farmacopea como herramienta para alcanzarla. *Revista de Fitoterapia*. 13. 101-122.
2. Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., & Ovidi, E. (2017). Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, 32(16), 1926–1950.
3. Shelar D. B, P.J. Shirote P. J. (2011) Natural Product in Drug Discovery: Back to Future. *Biomed Pharmacol J*;4(1)
4. Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). Passiflora: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23.
5. Gazola, A. C., Costa, G. M., Zucolotto, S. M., Castellanos, L., Ramos, F. A., de Lima, T. C. M., & Schenkel, E. P. (2018). The sedative activity of flavonoids from *Passiflora quadrangularis* is mediated through the GABAergic pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100(43), 388–393.
6. Cryan, J. F., & Sweeney, F. F. (2011). The age of anxiety: Role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1129–1161.
7. Shah, A. A., and Han, J. Y. (2015). Anxiety. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 21(3), 772-782.
8. Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioral Brain Research*, 352(October 2017), 81–93.
9. Bareño, L. (2020). *Determinación de los efectos antihipertensivos de fracciones aisladas de Passiflora quadrangularis L. en murinos* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia] Repositorio institucional UN.
10. Giovannitti J, Thoms S, Crawford J (2015) Alpha-2 adrenergic receptor agonists: a review of current clinical applications. *Anesth Prog. Spring*;62(1):31-9.
11. De Castro, P., Hoshino, A., Silva, J., & Mendes, F. (2007). Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. *Phytotherapy Research*, 21(5), 481-484.

12. Giraldo, Q. S. E., Bernal, L. M. C., Morales, R. A., Pardo, L. A. Z., & Gamba, M. L. (2015). Traditional use of medicinal plants in markets Bogotá, DC. *Nova*, 13(23), 73–80.
13. Bareño, Lesly L., Puebla, Pilar, et al. (2017). *Passiflora quadrangularis* L. Prevents experimental hypertension and vascular remodelling in rats exposed to nitric oxide deficit. *Vitae*, 24(3), 186-19.
14. Bourin, M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 295–303.
15. Wosch, L., dos Santos, K. C., Imig, D. C., & Santos, C. A. M. (2017). Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(1), 40–49.
16. Sakalem, Marna E, Negri, Giuseppina, & Tabach, Ricardo. (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 1219-1232.
17. Ramaiya, S., Bujang, J. and Zakaria, M., (2014). Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. *The Scientific World Journal*, 2014, pp.1-10.
18. Echeverry, Sandra M., Medina, Hilbert I., Costa, Geison M., & Aragón, Diana M. (2018). Optimization of flavonoid extraction from *Passiflora quadrangularis* leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(5), 610-617.
19. Porras, D. (2019). *Contribución al desarrollo de una formulación líquida de administración oral para un extracto de hojas de Passiflora quadrangularis L aplicando los conceptos del enfoque de calidad basada en el diseño (QbD)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional UN.
20. Bandelow, B., & Michaelis, S. (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 327–335.
21. Saloni Dattani, Hannah Ritchie and Max Roser (2021) - "Mental Health". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/mental-health>' [Online Resource].
22. Posada JA, Trevisi C. (2003) Prevalencia, severidad y necesidades no satisfechas del tratamiento de los trastornos de ansiedad, relacionados con sustancias, del estado de ánimo y del control de los impulsos en adultos según el Estudio Nacional de Salud Mental, Colombia, *MedUNAB*; 7:65-72

23. World Health Organization. (2017) Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva:7. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
24. Martin, E., Ressler, K., Binder, E. and Nemeroff, C. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatric Clinics of North America*, 32(3), 549-575.
25. Jesulola, E., Micalos, P. (2018). Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? *Behavioural Brain Research*, 341, 79-90.
26. Lawal, M., Omobayo, H., & Lawal, K. (2018). Epilepsy: Pathophysiology, clinical manifestations, and treatment options. *British Journal of Neuroscience Nursing*, 14(2), 58-72.
27. Gil-Nagel Rein, A., & Garca Morales, I. (2007). Etiopatogenia y Fisiopatología de la Epilepsia. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(75), 4806-4813.
28. Fonseca, L., Rodrigues, R., Ramos, A., da Cruz, J., Ferreira, J., Silva, J., & Amaral, A. (2020). Herbal Medicinal Products from Passiflora for Anxiety: An Unexploited Potential. *The Scientific World Journal*, 2020, 1-18.
29. Patel, S. Soni, H. et al. (2011). Recent updates on the genus Passiflora: A review. *International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology*.
30. Carvajal, L., Turbay, S., et al. (2014). Propiedades funcionales y nutricionales de seis especies de pasifloras del departamento del Huila. *Caldasia*, 36 (1), 1-15.
31. Steimer T. (2011) Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin. Neurosci.* 13(4):495–506.
32. Ospina-Chávez, J., J. Rincón-Velandia and M. Guerrero-Pabón. (2013). Perfil neurofarmacológico de la fracción butanólica de las hojas de *Cecropia peltata* L. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*. 42: 244-259.
33. Moreno L. (2015) Evaluación de los efectos de FCS304 en modelos de depresión en roedores (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
34. Hermida N. (2016). Perfil de tipo ansiolítico y/o antidepresivo del compuesto pirazolotriazinico MH4A en ratones albinos (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
35. Oviedo, V., García, M., Díaz, C., Marder, M., Costa, M., Rincón, J., Sánchez, C. Guerrero, M. (2009). Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con

- actividad de tipo ansiolítica en ratones. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 38 (1), 105-120.
36. Bonilla, J, Santa, A., Toloza, G., Espinoza P., Avalos, J., Nuñez, M., Moreno, M. (2014). Efecto sedante, ansiolítico y toxicológico del extracto acuoso de flores de *Erythrina berteroana* (pito) en ratones. *Revista Cuba de Plantas medicinales*, 19(4).
37. Bareño L. (2015) Estudio de la actividad antihipertensiva de *Passiflora quadrangularis* L en ratas con hipertensión inducida por déficit de óxido nítrico. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
38. Gazola, A., Costa, G., Castellanos, L., Ramos, F., Reginatto, F., Lima, T., & Schenkel, E. (2015). Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 25(2), 158-163.
39. Karim N, Khan I, Khan H, Ayub B, Abdel-Halim H and Gavande N. (2018) Anxiolytic Potential of Natural Flavonoids. *SM Journal of Endocrinology and Metabolism*, 4(1), 1018s.
40. Hritcu, L., Ionita, R., Postu, P., Gupta, G., Turkez, H., Lima, T., Carvalho, C. and de Sousa, D., (2017). Antidepressant Flavonoids and Their Relationship with Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp.1-18.
41. Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., Araujo-Escalona, A. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud mental*, 35(5), 375-384.
42. Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D. y Benítez, R., (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), pp.438-469.
43. Sun, A., Xu, X., Lin, J., Cui, X., & Xu, R. (2014). Neuroprotection by Saponins. *Phytotherapy Research*, 29(2), 187–200.
44. Mahato, S. B., Sarkar, S. K., & Poddar, G. (1988). *Triterpenoid saponins*. *Phytochemistry*, 27(10), 3037–3067.
45. Doyama, J., Rodrigues, H., Novelli, E., Cereda, E., & Vilegas, W. (2005). Chemical investigation and effects of the tea of *passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 371-374.
46. Calabrese, E. J., & Blain, R. B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, 157(1), 42–48.

47. Calabrese E. J. (2008). Hormesis and medicine. *British journal of clinical pharmacology*, 66(5), 594–617.
48. Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22(2), 5-14.
49. Bareño, L., Puebla, P., San Feliciano, A. Guerrero Pabón M. (2020). Vascular mechanisms of triterpenoid saponins isolated from *Passiflora quadrangularis* L. *Vitae*, 27(2).
50. Talke PO, Caldwell JE, Richardson CA, Heier T. (2000) The effects of clonidine on human digital vasculature. *Anesth Analg*, 91(4):793-7.
51. Rowe, A. (2019). The importance of selection and reporting of the sex of experimental animals. *Animal Production Science*, 59(3), 401.