



## **Evaluación del efecto neurofarmacológico de Soulatrólido, un compuesto aislado de *Calophyllum brasilense* Cambess (Calophyllaceae)**

Karla Lorena Álvarez Martínez<sup>1</sup>, Silvia Laura Guzmán-Gutiérrez<sup>2</sup>, Deisy Gasca-Martínez<sup>3</sup>, Ricardo Reyes-Chilpa<sup>4</sup>, Martha Alicia Deveze-Álvarez<sup>1</sup>, Clara Alba-Betancourt<sup>1</sup> y Ángel Josabad Alonso-Castro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N, 36050, Guanajuato, Gto., México;*

<sup>2</sup>*Inst. Investigaciones Biomédicas, Univ. Nacional Autónoma de México, México City, México;*

<sup>3</sup>*Inst. de Neurobiología, Univ. Nacional Autónoma de México, Querétaro, México;*

<sup>4</sup>*Inst. de Química, Univ. Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México*

### **Resumen**

La ansiedad es un trastorno incapacitante para diferentes aspectos de la vida diaria, reduce la productividad y aumenta el riesgo de padecer otro tipo de enfermedades. Los tratamientos comúnmente recomendados para este tipo de trastornos incluyen terapia cognitivo-conductual y medicamentos, usualmente antidepresivos y benzodiazepinas, los cuales están relacionados con una variedad de efectos adversos. Es por ello por lo que se vuelve necesario el buscar alternativas de tratamientos, en este trabajo proponemos un nuevo compuesto aislado de la planta Calophyllaceae que tiene efecto potencial sobre el control de la ansiedad.

Palabras clave: ansiedad, medicina alternativa, soulatrólido.

### **Abstract:**

Anxiety is a daily life disabling disorder, it reduces productivity and increases the risk of other diseases. The most common used and recommended treatments are cognitive-behavioral therapy and pharmaceuticals, mainly antidepressants and benzodiazepines, which are related to several adverse effects. Therefore, it becomes necessary to pursue new treatments, in this work we propose a new Calophyllaceae plant extracted compound which has a potential effect controlling anxiety.

Key words: anxiety, alternative medicine, soulatrolide.

### **Contenido:**

1. Introducción.
2. Modelos animales y protocolos de ansiedad.
3. Resultados Soulatrólido.
4. Conclusiones.
5. Referencias



## **1. Introducción:**

El término ansiedad proviene del latín “Anxietas”, significa estado prolongado de temor. La ansiedad se define como la activación del sistema nervioso central a causa de una situación novedosa(1), esta activación se traduce, por un lado, en síntomas periféricos derivados de la estimulación del sistema nervioso vegetativo (aumento del tono simpático) y del sistema endocrino (secreción de hormonas suprarrenales) (2), que darían lugar a los síntomas somáticos de ansiedad, y por otro, en síntomas de estimulación del sistema límbico (3) y de la corteza cerebral, que se traduce en los síntomas psicológicos de la ansiedad.

La ansiedad se manifiesta clínicamente cuando la corteza cerebral pierde su capacidad inhibitoria en el centro subtalámico, y hay una hipoactividad de las vías serotoninérgicas (4), observándose manifestaciones físicas como sudoración, tensión muscular, aumento del ritmo cardiaco, de la respiración, etc. (5). Sin embargo, cuando el cuadro de ansiedad aparece frente a estímulos o circunstancias que no justifican la respuesta, puede considerarse una patología, y se identifican algunos otros síntomas como hipervigilancia, insomnio, agitación, temblor, cansancio y déficit de concentración (6). Dentro de la ansiedad patológica se encuentra la ansiedad exógena (estrés) y la ansiedad endógena. La ansiedad exógena o estrés ocurre cuando se supera la capacidad adaptativa del organismo frente a estímulos externos, ya sea porque son muy persistentes o muy intensos, generalmente son estímulos novedosos, amenazantes o

sorprendentes. Por otro lado, la ansiedad endógena, carece de causa externa, se asocia con anomalías en los mecanismos cerebrales de procesamiento de la información procedente de los sentidos (7).

Se estima que los desórdenes de ansiedad afectan a un décimo de la población, y van en aumento (8). Son trastornos cuyo tratamiento y calidad en los cuidados de los individuos afectados son inadecuados (9). La ansiedad es un trastorno incapacitante para diferentes aspectos de la vida diaria, reduce la productividad y aumenta el riesgo de padecer otro tipo de enfermedades (10). Los tratamientos comúnmente recomendados para este tipo de trastornos incluyen terapia cognitivo-conductual (CBT) y medicamentos, usualmente antidepresivos y benzodiacepinas (11). Estos últimos pueden proporcionar un alivio rápido de la ansiedad y el insomnio, sin embargo, están relacionados con una variedad de efectos adversos (12).

La combinación de tratamientos convencionales alivia los síntomas en un 50-65% de los pacientes, aunque muchos continúan experimentando síntomas a pesar del tratamiento (13). En consecuencia, hay un aumento constante en el interés por estudiar nuevas alternativas de tratamiento. Algunas de ellas, los remedios herbolarios, sin embargo, la eficacia y la seguridad sólo se ha abordado adecuadamente en ensayos clínicos en los últimos 10 años (14). Los productos naturales son una fuente valiosa para el descubrimiento de sustancias con fines terapéuticos o precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica (15). En este contexto, las especies de



Calophyllum han tenido gran relevancia por sus efectos terapéuticos (16), Calophyllum brasiliensees Cambess (Calophyllaceae) es la especie más estudiada (17), se localiza en selvas tropicales de Sudamérica (18), y es una fuente importante de productos naturales altamente activos, por ejemplo, compuestos fenólicos simples, triterpenos, esteroides, flavonoides, xantonas, cromononas y cumarinas (19). En particular estos últimos compuestos son los responsables de muchas de las actividades farmacológicas atribuidas a la especie, se han encontrado dos quimiotipos, las cumarinas tipo mammea, 5- dihidroxicumarinas, de las cuales destacan la Mammea A/BA y A/BB, activas contra varias líneas celulares de leucemia humana (20), Trypanosoma cruzi (21) y Leishmania amazonensi (22) y el segundo quimiotipo, las cumarinas del tipo dipirano-tetracíclicas, soulatrólido, potente inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH-1(16) y actividad contra Mycobacterium tuberculosis (23).

## **2. Modelos animales y protocolos de ansiedad**

En la búsqueda de la actividad neurofarmacológica de muchos de estos compuestos es necesario emplear ensayos que permitan obtener información valiosa (29).

Los modelos animales han sido una herramienta clave en la investigación, pues han permitido esclarecer procesos fisiológicos, bioquímicos, conductuales y demás, que se asemejan a los procesos respectivos en el ser humano (30). Lo que permite alcanzar una mayor comprensión en una gran variedad de campos, así como predicciones más acertadas en cuanto a

respuestas del organismo ante diversos estímulos, ambientes y tratamientos (31). Los modelos animales utilizados en el estudio de la ansiedad incluyen a los modelos condicionados y a los modelos no condicionados (32). Los modelos no condicionados no requieren entrenamiento y son menos susceptibles a la interferencia de procesos mnemónicos o motivacionales (33). Algunos ejemplos incluyen, el estudio de patrones de actividad exploratoria espontánea en individuos expuestos a ambientes desconocidos que, invariablemente, incluyen áreas de seguridad. Como ejemplos de este tipo de paradigmas podemos citar el campo abierto (34), las transiciones luz oscuridad (35) y el laberinto en cruz elevado (36). En estos modelos el análisis de la conducta emplea medidas espacio-temporales, mientras que en el caso del laberinto en cruz elevado, se cuantifica el tiempo de permanencia en el área expuesta, con respecto al tiempo de permanencia en el área no expuesta, con respecto al tiempo total de la prueba (37).

Campo abierto, el procedimiento consiste en someter al animal a un ambiente desconocido, con iluminación sobre o bajo el campo (38). El animal se coloca en el centro del aparato y se registran varios elementos por un periodo definido, el cual va desde los 2 a los 20 minutos; se registra la locomoción horizontal y la frecuencia de actividad vertical (39). En ese entorno, el animal gasta más tiempo sobre la periferia y no sobre las partes centrales del campo abierto (40).

La prueba de luz-oscuridad está basada en la aversión de los roedores a espacios extraños e iluminados (41).



La situación natural cuando el animal está expuesto a un ambiente desconocido es evitarlo (42), sin embargo, el aumento de conductas exploratorias se refleja como resultado de la actividad neurofarmacológica de algunas drogas (43), siendo entonces el área segura el compartimento oscuro y el área aversiva el compartimento iluminado. Por lo tanto, en esta prueba se registra el tiempo que el roedor permanece en cada espacio, así como las entradas y salidas (44), lo cual indicará el grado en que el compuesto ansiolítico facilita la actividad exploratoria, por lo que en las condiciones de la prueba se deben evitar factores estresantes externos (45).

El laberinto en cruz elevado, en la que también se explota la aversión natural del roedor a los campos expuestos (46) se basa en un campo elevado, con brazos cerrados y otros abiertos, expresándose el nivel de ansiedad por el número de entradas y el tiempo que permanece en el área aversiva (47).

En conjunto, estas pruebas conductuales presentan una alta sensibilidad a los tratamientos farmacológicos, permitiendo evaluar la ansiedad del roedor.

### **3. Resultados Soutatrólido**

Se probaron 3 concentraciones diferentes del compuesto soulatrólido: 1, 10 y 50 mg/kg de peso de cada ratón de la cepa CD1, obtenidos del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Como control positivo se utilizó clonazepam en concentración de 1mg/kg de peso y como control negativo solución salina.

#### **3.1. Laberinto en cruz elevado**

En esta prueba se comparan varios parámetros como son el número de entradas a zona central del laberinto, considerada como una zona de decisión, los animales tratados con las concentraciones de 10 y 50mg/kg de peso tuvieron efectos similares al clonazepam, indicando que este compuesto disminuye la ansiedad del animal al permanecer más tiempo en esta zona.

Los animales tratados con soulatrólido 10mg/kg tuvieron un número importante de entradas a los brazos abiertos, aunque no es significativamente diferente del control negativo.

#### **3.2. Campo abierto**

La naturaleza del roedor es evitar las zonas expuestas que corresponden al área central del cuadrado que abarca el campo abierto, y tiende a pasar más tiempo en la periferia. Es muy notorio el comportamiento de los animales tratados con soulatrólido a 1mg/kg ya que permanecieron significativamente menos tiempo en la periferia y más tiempo en la zona central.

#### **3.3. Transición luz/oscuridad**

Los ratones tratados con soulatrólido en las 3 concentraciones, permanecieron más tiempo en la zona iluminada de la caja utilizada para este tipo de protocolo, siendo que de manera natural, los ratones prefieren permanecer en la zona oscura y protegida de la caja.



#### 4. Conclusión

El soulatrólido, una cumarina extraída de las hojas de *Calophyllum brasiliense* presentó una actividad importante en la disminución de los niveles de ansiedad. En la prueba de campo abierto, a concentración de 1mg/kg mostró una actividad similar a nuestro control con clonazepam 1.0 mg/kg. El mismo efecto se apreció en el modelo de transición luz/ oscuridad, aunque resaltó el efecto en el grupo tratado con 50 mg/kg del soulatrólido. Sin embargo, es importante resaltar que el efecto ansiolítico determinado para este compuesto no es superior al que se presenta con clonazepam 1.0 mg/kg.

#### 5. Referencias

1. García, J. C. C., Calvo, E. H. (2002). Trastornos de ansiedad. *Tiempos médicos: revista de educación médica continuada*, (594), 9-18.
2. Ledoux J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Ann Rev Psychol*, 46:209-235
3. Pratt J.A. (1992). The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther*, 55:149-181.
4. Reyes-Ticas, J. A. (2010). Trastornos de ansiedad: Guía práctica para diagnóstico y tratamiento. *Biblioteca virtual en salud*.
5. Baronet Jordana, G. (2010). Trastornos por ansiedad. *El Farmacéutico Hospitales*, (195).
6. Kaplan H.I., Sadock B.J. (1991). *Synopsis of Psychiatry*. Williams & Wilkins, Baltimore. 389-394.
7. García, J. B., Martínez, P. A. S. (1999). Trastornos de ansiedad. *Medicine*, 7(106), 4952-4962.
8. Nutt DJ, Kessler RC, Alonso J, et al. (2007). Consensus statement on the benefit to the community of ESEMeD (European study of the epidemiology of mental disorders) survey data on depression and anxiety. *J Clin Psychiatry*. 68: 42–8.
9. Stein M, Sherbourne C, Craske M, et al. (2004). Quality of care for primary care patients with anxiety disorders. *Am J Psychiatry*. 161: 2230–7.
10. Alonso J, Angermeyer M, Bernert S, et al. (2004). Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the epidemiology of mental disorders (ESEMeD) project. *Acta Psychiatr Scand*. 109:21–7.
11. Hidalgo RB, Tupler LA, Davidson JR. (2007) An effect-size analysis of pharmacologic treatments for generalized anxiety disorder. *J Psychopharmacol*. 21:864–72.
12. Ashton, H. (2005). The diagnosis and management of benzodiazepine dependence. *Curr Opin Psychiatry*. 18: 249–255.
13. Baldwin DS, Polkinghorn C. (2005). Evidence-based pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *Int J Neuropsychoph*. 8:293–302.
14. Liu L, Liu C, Wang Y, et al. (2015). Herbal medicine for anxiety, depression and insomnia. *Curr Neuropharmacol*. 13:481–93.



15. Butler, M.S., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 31: 1612-1661.
16. Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JH II, Mc-Mahon JB, Currens MJ, et al. The Calanolides, a novel HIV inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J Med Chem.* 1992 Jul; 35 (15): 2735-2743.
17. Stevens PF. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *J Arnold Arbor.* 1980 Apr; 61 (2): 117-171.
18. Rodríguez ME, Cardozo AE, Krauczuk ER, Fontana JL, Iriart D. *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae): Nuevo registro para la flora de la Argentina. *Bol Soc Argent Bot.* 2009 Ago-Dic; 44 (3-4): 361-366.
19. Julio César García-Zebadúa, Ricardo Reyes-Chilpa, Maira Huerta-Reyes, Jorge Iván Castillo-Arellano, Sandra Santillán-Hernández, Beatriz Vázquez-Astudillo, José Alberto Mendoza-Espinoza. (2014). EL ÁRBOL TROPICAL *Calophyllum brasiliense*: UNA REVISIÓN BOTÁNICA, QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA. *VITAE*, 21(2): 126-145.
20. Ito, C., Murata, T., Itoigawa, M., Nakao, K., Kaneda, N., Furukawa, H., 2006. Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 975-980.
21. Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., Hernández-Ortega, S., 2008. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 431-436.
22. Brenzan, M.A., Nakamura, C., Prado Dias Filho, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M., Aparício Garcia Cortez, D., 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 101, 715-722.
23. Kashman, Y., Gustafson, K.R., Fuller, R.W., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Currens, M.J., Buckheit, R.W., Hughes, S.H., Cragg, G.M., Boyd, M.R., 1992. The calanolides, a novel HIV inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.* 35, 2735-2743.
24. Pires, C.T.A.T., Brenzan, M.A.A., Scodro, R.B. de L.B., Cortez, D.A.G.A., Lopes, L.D.G.D., Siqueira, V.L.D.L., Cardoso, R.F.F., 2014. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 324-329.
25. Y.B. Wu, Z.Y. Ni, Q.W. Shi, M. Dong, H. Kiyota, Y.C. Gu, B. Cong, (2012), Constituents from *Salvia* species and their biological activities, *Chem. Rev.* 112: 5967-6026.
26. L. Rodriguez-Hahn, B. Esquivel, A.A. Sanchez, J. Cárdenas, O.G. Tovar, M. Soriano-Garcia, A. Toscano, (1988), Puberulin and isopuberulin, benzonorcaradiene and benzocycloheptatriene



diterpenoids of clerodanic origin from *Salvia puberula*, *J. Organomet. Chem.* 53: 3933–3936.

27. G.X. Hu, C.L. Xiang, E.D. Liu, (2013), Invasion status and risk assessment for *Salvia tiliifolia*, a recently recognised introduction to China, *Weed Res.* 53: 355–361.

28. Min Fan, Ying Bao, Zhi-Jun Zhang, Hong-Bin Zhang, Qin-Shi Zhao, (2017), New neo-clerodane diterpenoids with neurotrophic activity from the aerial parts of *Salvia tiliifolia*, *Fitoterapia.* 123: 44-50.

29. González-Chávez, M. M., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., Arana-Argáez, V., Torres-Romero, J. C., Medina-Rivera, Y. E., ... & Pérez-Gutiérrez, S. (2018). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of tilifodiolide, isolated from *Salvia tiliifolia* Vahl (Lamiaceae). *Drug development research*, 79(4), 165-172.

30. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21:205555–35.

31. Mora Gallegos, A., & Salas Castillo, S. (2014). Animal models of fear and anxiety: neurobehavioral descriptions. *Actualidades en Psicología* Vol. 28 Núm. 117 2014.

32. Hau, J. (2003). Animal models. En Hau, J. & VanHoosier G.L (eds.), *Handbook of Laboratory Animal Science* (pp. 8-16). EEUU: CRC Press.

33. Becerra-García, A. M., Madelena, A. C., Estanislau, C., Rodríguez-Rico, J. L., Dias, H. (2007). Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y

maladaptaciones. *Revista Latinoamericana de psicología*, 39(1), 75-81.

34. Rodgers R.J. (1997) Animal models of anxiety: where next? *Behav Pharmacol*, 8:477-496, 1997.

35. Walsh R.N., Cummins R. A. (1976). The open-field test: a critical review. *Psychol Bull*, 83:482-504.

36. Crawley, J., & Goodwin, F.K., (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 13, 167–170.

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

38. Dawson G.R., Tricklebank M.D. (1995). Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*, 16:33-36.

39. Belzung, C., 1999. Measuring exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.), *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. Elsevier, Amsterdam, pp. 739– 749.

40. Takahashi, L.K., Kalin, N.H. (1989). Role of corticotropin-releasing factor in mediating the expression of defensive behavior. In: Blanchard, R.J., Brain, P.F., Blanchard, D.C., Parmigiani, S. (Eds.), *Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior*. NATO ASI Series. Kluwer Academic



Publishing, Kluwer, Dordrecht, Boston, London, pp. 580–594.

41. Kopp, C., Misslin, R., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Guardiola-Lemaitre, B., 1997. Effects of day-length variations on emotional responses toward unfamiliarity in Swiss mice. *Behav. Proc.* 41, 151–157.

42. Crawley, J.N., Goodwin, F.K., (1980). Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13:167–170.

43. Voikar V, Vasar E, Rauvala H. Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6 J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes Brain Behav* 2004; 3:27–38

44. Njung'e, K., Handley, S.L., (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38 (1):63–67.

45. Sanchez, C., (1996). 5HT1A receptors play an important role in modulation of behaviour of rats in a two-compartment black and white box. *Behav. Pharmacol.* 7: 788–797.

46. Belzung, C., Le Pape, G., 1994. Comparison of different behavioural test situations used in Psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 3, 623– 628.

47. Asano Y., (1986). Characteristics of open field behaviour of Wistar and Sprague–Dawley rats. *Exp Anim*; 35:505–8.