

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTICRISIS Y NEUROPROTECTORES DEL
EXTRACTO METANÓLICO COMPLETO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata*
Y ANALISIS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE SUS METABOLITOS
SECUNDARIOS EN EL SITIO DE UNIÓN EXTRACELULAR DE
BENZODIACEPINAS DEL RECEPTOR GABA-A.**

MAYRA LILIANA PIZARRO LOAIZA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
SANTIAGO DE CALI
2022**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTICRISIS Y NEUROPROTECTORES DEL
EXTRACTO METANÓLICO COMPLETO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata*
Y ANALISIS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE SUS METABOLITOS
SECUNDARIOS EN EL SITIO DE UNIÓN EXTRACELULAR DE
BENZODIACEPINAS DEL RECEPTOR GABA-A.**

MAYRA LILIANA PIZARRO LOAIZA

Tesis Doctoral para optar por el título de Doctora en Ciencias Biomédicas

DIRECTOR

**LEONARDO FIERRO PEREZ
Ph.D. FISILOGIA Y BIOFISICA**

CODIRECTOR

**EFRAÍN BURITICÁ
Ph.D CIENCIAS BIOMÉDICAS**

ASESORES

**NORBERTO GARCÍA-CAIRASCO
Ph.D. FISIOLÓGÍA**

SANTIAGO CASTAÑO

Ph.D. CIENCIAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

SANTIAGO DE CALI

2022

COMITÉ ASESOR

Olagide Wagner de Castro

Profesional en Ciencias Biológicas, MSc., Ph.D. Fisiología

Gabriel Arteaga Díaz

Psicólogo, MSc. en Psicología, Ph.D. Ciencias Biomédicas

Diana Marcela González Duque

Médico, MSc., Candidata a PhD Ciencias Biomédicas.

Melissa Mejía-Gutiérrez

Química, MSc. Ciencias Biomédicas, Estudiante de PhD.

Gabriel Servilha-Menezes

Profesional en Ciencias Biomédicas, Estudiante de Maestría en Fisiología

Johan Felipe Navia Pizo

Tecnólogo en Electrónica y Estudiante de Química

A mi madre Liliana Loaiza
por su gran amor que se que aún en parte de su mente lleva para mi
A mi padre Carlos Pizarro por ser mi apoyo incondicional,
A mi hermano Alex
quien impuso el reto de seguir estudiando
A mis locos sobrinos Jero, Isa y Violeta
por llenarme de alegrías
A mis abuelos Edgardo y Carlos
que se sentirían orgullosos de mí de estar presentes
“Finalmente si hubo científico(a) en la familia”
A mi abuelita Margarita
Por su apoyo y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Durante mi doctorado he tenido la fortuna de contar con personas maravillosas a mi lado y primero que todo quiero agradecer a toda mi familia por su apoyo en este camino, en especial a mis padres, hermano, a mi abuela Margarita, mis abuelos y mis sobrinos los cuales sin importar el tiempo y la distancia me llenan de amor y felicidad.

A mis amigos de postgrado Kathe, Claudia, Maguie, Nata, Mauro y Gonza. Quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas conmigo lo cual me ha formado y fortalecido en el transcurso de esta meta. A mi compañerito de proyecto Libardo por aguantarme cada regaño para sacar adelante este trabajo.

A mi asesor y amigo Santiago gracias por su paciencia y guía en el proyecto. A mi director Leonado Fierro por permitirme regresar a la investigación e iniciar un camino cumpliendo mis sueños y metas como investigadora. A mi codirector Efraín Buriticá de quien he aprendido muchísimo y me permitió regresar al mundo microscópico que tanto me gusta. A mi asesor el profesor Norberto García-Cairasco de quien tuve la oportunidad de aprender otra forma de hacer ciencia.

A mi comité asesor, Olagide, Gabriel Arteaga, Diana, Melissa, Gabriel Servhila y Felipe, un poco grande pero que me permitió conocer a grandes investigadores y obtener de ellos valiosos aprendizajes.

A los grupos Farmacología Univalle, Centro de Estudios Cerebrales, Grupo de Investigación Clínica en Psicología, Neuropsicología y Neuropsiquiatría de la Universidad del Valle y al Laboratorio de Neurofisiología y Neuroetología Experimental en la Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto por el apoyo en la ejecución de este proyecto.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

Los medicamentos anticrisis epilépticas convencionales utilizados controlan sólo dos tercios de los casos, lo que impulsa la búsqueda de nuevos tratamientos, como el uso de fitomedicamentos. En varios países es común el uso de productos naturales como tratamiento farmacológico, debido a esto, es importante estudiar las propiedades anticrisis que pudieran tener esos productos naturales. Considerando lo anterior, se estudió los efectos anticrisis y neuroprotectores del extracto metanólico completo de las hojas de *Annona muricata*, y se analizó el acoplamiento molecular de sus metabolitos secundarios en el sitio de unión extracelular de benzodiazepinas del receptor GABA-A. Para ello, se evaluó el efecto de tres dosis del extracto entero (250 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg), mediante el registro video-electroencefalográfico de crisis inducidas en ratas Wistar, por medio del biomodelo de *Status Epilepticus* por pilocarpina (PILO) intrahipocampal, y el análisis morfológico de la inmunohistoquímica del tejido comprometido con el anticuerpo Anti-parvalbúmina (Anti-PV). Adicionalmente se realizó una caracterización del extracto completo empleado y se analizó el acoplamiento molecular de los metabolitos secundarios aquí presentes y de los reportados en literatura en el sitio de unión extracelular de benzodiazepinas del receptor GABA-A. Encontrando, ausencia de crisis de etapas 3, 4 y 5 de Racine en los animales tratados, con una acción anticrisis por disminución de la potencia espectral en los registros con inyección de PILO de los animales tratados con la dosis de 250 mg/Kg más no de las otras dos dosis evaluadas. Adicionalmente esta dosis produce un aumento en la densidad celular, la forma y área del soma de células PV+ diferenciada del resto de tratamientos y controles. De otro lado los análisis de acoplamiento molecular permitieron establecer en el extracto y en los metabolitos secundarios reportados a los compuestos n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y Annonaine como posibles candidatos farmacológicos interactuantes con el sitio de unión de la benzodiazepinas en el receptor GABA-A, debido a la presentación de una alta energía de acoplamiento y estabilidad de unión en el tiempo y características similares a las de un fármaco oral que incluyen, paso de la barrera hematoencefálica y absorción gastrointestinal. Es por ello que el presente trabajo reafirma la hipótesis de efecto anticrisis de los extractos y/o compuestos encontrados en *A. muricata* y deja abierta una puerta para la continuación de evaluación de los compuestos dilucidados de manera computacional en experimentación *in vivo* que refuerce los resultados de este estudio.

Palabras clave: *Annona muricata*, Status epilepticus, Neuroprotección, Video-Electroencefalografía, Anti- PV, Acoplamiento molecular, Receptor GABA-A.

Abstract

The conventional anti-seizure medications used control only two thirds of the cases, this promotes the search for new treatments, such as the use of phytomedicines. In several countries, the use of natural products as pharmacological treatment is common, due to this, it is important to study the anti-crisis properties that these natural products could have. Considering the above, the anti-seizure and neuroprotective effects of the whole methanolic extract of *Annona muricata* leaves were studied, and the molecular coupling of its secondary metabolites in the extracellular benzodiazepine binding site of the GABA-A receptor was analyzed. For this, the effect of three doses of the whole extract (250 mg/kg, 500 mg/kg and 1000 mg/kg) was evaluated by video-electroencephalographic recording of seizures induced in Wistar rats, using the *Status Epilepticus* biomodel by intrahippocampal pilocarpine (PILO), and the morphological analysis of the immunohistochemistry of the tissue compromised with the effective Anti-parvalbumin (Anti-PV). In addition, a characterization of the whole extract used was carried out and the molecular content of the secondary metabolites present here and of the reports in the literature in the extracellular binding site of benzodiazepines of the GABA-A receptor was analyzed. Finding, absence of crises of stages 3, 4 and 5 of Racine in the treated animals, with an anti-crisis action due to a decrease in the spectral power in the records with PILO injection of the animals treated with the dose of 250 mg/Kg plus no of the other two doses evaluated. In addition, this dose produces an increase in the cell density, the shape and the area of the soma of PV+ cells differentiated from the rest of the treatments and controls. On the other hand, the molecular storage analyzes allowed to establish in the extract and in the reported secondary metabolites the compounds n-(2-(1-methylcyclopropyl)phenyl)-4-chlorobenzamide and Annonaine as possible pharmacological candidates interacting with the binding site. of benzodiazepines at the GABA-A receptor, due to the presentation of a high sugar energy and binding stability over time and characteristics like those of an oral drug, including, permeate of the blood-brain barrier and gastrointestinal absorption. That is why the present work reaffirms the hypothesis of the anti-crisis effect of the extracts and/or compounds found in *A. muricata* and leaves a door open for the next evaluation of the computationally elucidated compounds in in vivo experimentation that reinforces the results. of this study.

Key words: *Annona muricata*, Status epilepticus, Neuroprotection, Video-Electroencephalography, Anti- PV, Molecular docking, GABA-A receptor.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	17
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1. EPILEPSIA	19
1.1.1. Crisis epilépticas	19
1.1.2. Tipos de crisis epilépticas.....	20
1.2. MODELOS MURINOS DE EPILEPSIA	21
1.2.1. Modelo murino de epilepsia hipocampal.....	22
1.2.2. Interneuronas GABAérgicas hipocampales y técnicas de marcaje inmunohistoquímico.....	23
1.2.3. Sistemas de registro electrofisiológico en modelos murinos de epilepsia	24
1.3. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA EPILEPSIA	25
1.3.1. Tratamientos anticonvulsivantes naturales	26
1.3.2. Receptor GABA _A como blanco farmacológico	29
1.4. ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTICRISIS	29
1.4.1. Acoplamiento molecular	30
1.4.2. Dinámica molecular	30
2. ANTECEDENTES	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GENERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	35
3.2.1. Evaluar los efectos anticrisis y neuroprotectores del extracto metanólico completo de las hojas de <i>Annona muricata</i> en un modelo experimental de PILO-SE en ratas.	35
3.2.2. Analizar el acoplamiento molecular de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico completo de las hojas de <i>Annona</i> <i>muricata</i> en el sitio de unión extracelular de benzodiazepinas del receptor GABA-A.....	35
3.2.3. Analizar el acoplamiento molecular de metabolitos secundarios de <i>Annona muricata</i> en el sitio de unión extracelular de benzodiazepinas del receptor GABA-A.....	35

4.	CAPÍTULO 1.....	36
4.1.	METODOLOGÍA.....	36
4.1.1.	Tipo de estudio, población y muestra	36
4.1.1.	Preparación del extracto entero metanólico de <i>Annona muricata</i>	37
4.1.2.	Determinación de dosis letal 50 (DL50).....	37
4.1.3.	Video-encefalografía y estatus epiléptico con pilocarpina	38
4.1.4.	Evaluación de neuroprotección	40
4.1.5.	Análisis estadístico	41
4.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.2.1.	Preparación del extracto entero metanólico de <i>Annona muricata</i>	43
4.2.2.	Dosis letal 50 y dosis experimentales.....	43
4.2.3.	Video-electroencefalografía y estatus epiléptico con pilocarpina	43
4.2.4.	Evaluación de neuroprotección	56
4.3.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
5.	CAPÍTULO 2.....	61
5.1.	METODOLOGÍA.....	61
5.1.1.	Caracterización GC del extracto entero metanólico de <i>Annona muricata</i>	61
5.1.2.	Análisis <i>in silico</i> del extracto entero metanólico de las hojas de <i>Annona muricata</i>	61
5.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.2.1.	Caracterización GC del extracto entero metanólico de las hojas de <i>Annona muricata</i>	65
5.2.2.	Análisis de biodisponibilidad <i>in silico</i> : propiedades fisicoquímicas y farmacológicas	68
5.2.3.	Acoplamiento molecular	74
5.2.4.	Interacciones y dinámica molecular.....	76
5.3.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
6.	CAPÍTULO 3.....	83
6.1.	METODOLOGÍA.....	83
6.1.1.	Selección de ligandos	83

6.1.2. Análisis <i>in silico</i> de compuestos reportados en extractos de <i>A. muricata</i>	83
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
6.2.1. Selección, análisis de ligandos y acoplamiento molecular.....	85
6.2.2. Análisis de biodisponibilidad <i>in silico</i> : propiedades fisicoquímicas y farmacológicas	91
6.2.3. Interacciones moleculares.....	93
6.2.4. Dinámica molecular	98
6.3. CONCLUSIÓN.....	100
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	101
8. CONCLUSIONES GENERALES	104
9. RECOMENDACIONES.....	105
10. BIBLIOGRAFÍA.....	106
11. ANEXOS.....	116
11.1. ANEXO 1. Protocolo de inmunohistoquímica para parvalbúmina	116
11.2. ANEXO 2. Estadística descriptiva e inferencial de parámetros morfológicos.....	119
11.2.1. Número de procesos en células PV+	119
11.2.2. Área del soma de células PV+	121
11.2.3. Forma de células PV+.....	123
11.2.4. Densidad celular	125

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción de medicamentos usados como antiepilépticos (19)	26
Tabla 2. Escala modificada de Racine (60)	39
Tabla 3. Prueba de Games-Howell para comparación de latencia de Etapa 1 de escala de Racine	46
Tabla 4. Prueba de Games-Howell para comparación de latencia de Etapa 2 de escala de Racine	46
Tabla 5. Prueba de Games-Howell para comparación de latencia electroencefalográfica	47
Tabla 6. Compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i>	66
Tabla 7. Análisis de la acción y sus fuentes de extracción de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i> (90,92,93,95–100)	67
Tabla 8. Radar de biodisponibilidad de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero metanólico de las hojas de <i>A. muricata</i> parte 1.	69
Tabla 9. Radar de biodisponibilidad de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i> parte 2.	70
Tabla 10. Radar de biodisponibilidad de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i> parte 3.	71
Tabla 11. Radar de biodisponibilidad de los fármacos diazepam y flumazenil	72
Tabla 12. Resultados SwissADME de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil parte 1.	73
Tabla 13. Resultados SwissADME de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil parte 2.	74
Tabla 14. Resultados SwissADME de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil parte 3.	75
Tabla 15. Resultados de docking molecular de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero metanólico de las hojas de <i>A. muricata</i> y los fármacos Diazepam y Flumazenil.	76
Tabla 16. Interacciones moleculares receptor GABA _A -ligando.	79
Tabla 17. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de <i>A. muricata</i> en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA _A .	86
Tabla 18. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de <i>A. muricata</i> en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA _A .	87

Tabla 19. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de <i>A. muricata</i> en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA _A	88
Tabla 20. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de <i>A. muricata</i> en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA _A	89
Tabla 21. Docking scores, farmacocinética y bioactividad de compuestos reportados para <i>A. muricata</i> con menor docking scores que el diazepam en el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA-A.....	89
Tabla 22. Resultados SwissADME de alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil.	92
Tabla 23. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> acorde a el servicio web PLIP (83)	96
Tabla 24. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil acorde a el servicio web PLIP (83).....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de interneuronas en hipocampo. Capas: Ori, estrato oriens; Pry, estrato piramidal; Rad, estrato radiado; Lac, estrato lacunoso; Mol, estrato molecular; DG, giro dentado (26).	24
Figura 2. Componentes de registro de información electrofisiológica (28)	24
Figura 3. Procesos desarrollados durante el acoplamiento molecular.	30
Figura 4. Protocolo OECD para la determinación de dosis letal 50 con inicio en dosis 300 mg/Kg	38
Figura 5. Implantación de electrodos de registro bajo marco estereotáxico.	39
Figura 6. Parámetros comportamentales evaluados en video-EEG. a. Porcentaje de animales que presentan el parámetro evaluado (n=7 por tratamiento). b. Porcentaje de animales con mayor permanencia en cada etapa de Racine en 5 ventanas de 2 minutos en 30 minutos por tratamiento.	44
Figura 7. Latencia de etapas de Racine (a. Etapa 1 = Movimientos Orofaciales, b. Etapa 2= Oscilaciones de la cabeza). * corresponde a un $p<0.05$	46
Figura 8. Latencia electroencefalográfica. * corresponde a un $p<0.05$	47
Figura 9. Espectrograma de la transformada continua wavelet Morlet en animales tratados con vehículo (a.), 250 (b.), 500 y (c.) 1000 mg/Kg de extracto entero metanólico de <i>A. muricata</i>	48
Figura 10. Potencias medias espectrales ($\mu\text{v}^2/\text{Hz}$) obtenidas a partir de la transformada de Fourier en cada frecuencia según Dosis de tratamiento y Momento	49
Figura 11. Potencias espectrales medias suavizadas ($\mu\text{v}^2/\text{Hz}$) según Dosis de tratamiento y Momento.	50
Figura 12. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de normalidad. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	51
Figura 13. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de homogeneidad de varianzas. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	52
Figura 14. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de Kruskal-Wallis. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	53
Figura 15. Potencias espectrales medias suavizadas ($\mu\text{v}^2/\text{Hz}$) según Momento y Dosis de tratamiento.	54
Figura 16. Comparación entre Momentos: Valores-p de las pruebas de hipótesis de normalidad. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	54

Figura 17. Comparación entre Momentos: Valores-p de las pruebas de hipótesis de homogeneidad de varianzas. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	55
Figura 18. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de Kruskal-Wallis. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	55
Figura 19. Comparación múltiple de Nemenyi entre los momentos evaluados para la dosis de tratamiento 250 mg. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.	56
Figura 20. Análisis morfológico a través de los parámetros # de procesos primarios, Área del soma, Forma del soma y Densidad celular de células PV+ en corteza, CA1, CA3 e Hilus en controles y animales tratados con vehículo, 250, 500 y 1000 mg/Kg de extracto entero metanólico de <i>A. muricata</i>	58
Figura 21. Receptor GABAA. Los aminoácidos representados en verde forman el sitio de acoplamiento (ECD del sitio de benzodiazepinas de alta afinidad). En naranja se representan los ligandos.	63
Figura 22. Cromatograma de gases del extracto entero metanólico de las hojas de <i>A. muricata</i>	65
Figura 23. Interacciones moleculares receptor GABA _A -ligando en 2D de acuerdo a LigPlot++(82). a. n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, b. Diazepam y c. Flumazenil.	77
Figura 24. Interacciones moleculares receptor GABA _A -ligando en 3D visualizadas en pymol (84). a. n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, b. Diazepam y c. Flumazenil.	78
Figura 25. RMSD del receptor GABAA sin ligando y en los complejos con n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, Flumazenil y Diazepam	80
Figura 26. Rgyr del receptor GABAA sin ligando y en los complejos con n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, Flumazenil y Diazepam.	81
Figura 27. Estructura de los alcaloides quinolínicos de <i>A. muricata</i> con mayor docking score en el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA-A, Diazepam y Flumazenil.	90
Figura 28. Análisis de farmacóforo basado en las estructuras de alcaloides quinolínicos de <i>A. muricata</i> con mejor docking score en el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA _A y diazepam. A. Annonaina, b. Xilopina, c. Isolaurelina, d. Nornuciferina, e. Asimilobina, f. Annonamina y g. Diazepam.	90
Figura 29. Radar de biodisponibilidad de alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil.	91

Figura 30. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> visualizadas en 3D en pymol (84).	93
Figura 31. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil visualizadas en 3D en pymol (84).	94
Figura 32. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de <i>A. muricata</i> , diazepam y flumazenil; de acuerdo a LigPlot++ (82) 95	
Figura 33. RMSD obtenido de la simulación de dinámica molecular del receptor de GABA _A sólo y en complejo con Annonaina, Diazepam y Flumazenil.	99
Figura 34. Rgyr obtenido de la simulación de dinámica molecular del receptor de GABA _A sólo y en complejo con Annonaina, Diazepam y Flumazenil.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

CB: Calbindina
CR: Calretinina
ECD: Dominio extracelular
EEG: Electroencefalografía
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
GC-MS: Cromatografía de gases-masas
NADH: Nicotinamina adenina dinucleótida
NMDA: N-methyl-D-aspartato
PDB: Protein data bank
PILO: Pilocarpina
PLP: paraformaldehído al 2%, lisina HCl al 1,5% y metaperiodato de sodio al 0,2% en tampón fosfato 0,2 M pH 7,4
PTZ: Pentilenetetrazol
PV: Parvalbúmina
PV+: Parvalbúmina positivas
Rgyr: Radio de giro
RMSD: Desviación cuadrática media
SE: Status Epilepticus
SST: Somatostatina
VPI: Péptido intestinal vasoactivo

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad crónica del cerebro caracterizada por desequilibrios episódicos recurrentes, y una impredecible interrupción de la función normal encefálica denominada crisis (1,2). Se estima que el 85% de la epilepsia a nivel mundial se presenta en países subdesarrollados, donde no hay una atención médica satisfactoria (2,3). En Colombia en el año 2003 se reportó una prevalencia de 10.3 pacientes con epilepsia por cada 1000 habitantes (4).

Una crisis epiléptica puede generar déficit cognitivo, que se puede manifestar como problemas en la percepción, atención, emoción, memoria, ejecución, praxis o lenguaje (5). Estos problemas aumentan el riesgo de muerte temprana, en parte debido a que las drogas anticrisis convencionales las controlan en solo dos tercios de los casos, lo que plantea la búsqueda de nuevos esquemas de tratamiento anticrisis (6–10). En este contexto, una opción interesante son los fitomedicamentos, bien sea como una opción para el tratamiento o como agentes sinérgicos de los tratamientos convencionales. Ello teniendo en cuenta que en la medicina natural se origina buena parte de la farmacoterapia moderna, y algunas de las más importantes y eficaces drogas son derivadas de compuestos naturales (11)(12). Adicionalmente, es importante tener en cuenta que, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el 80% de los pacientes con epilepsia en países en desarrollo emplean la fitomedicina como la base o apoyo a su tratamiento (13).

Sin embargo, si bien el uso de la fitomedicina es muy común en Latinoamérica, la mayoría de los estudios enfocados al estudio del efecto anticrisis de extractos de plantas son africanos y asiáticos. No obstante, muchas de estas plantas se encuentran ampliamente distribuidas. De otro lado las propiedades del suelo de una región a otra pueden cambiar sus características químicas y así generar efectos anticrisis variados. Adicionalmente, para integrar los fitofármacos en la atención básica de la salud, es necesario utilizar y autenticar científicamente los productos provenientes de las plantas (14).

Una de las familias de plantas más empleadas en fitomedicina, corresponde a la familia Annonaceae, que incluye al género *Annona*, del cual la mayoría de sus especies crecen en regiones tropicales como el oeste de la India; norte y sur América; África; islas del Pacífico y el sureste de Asia (14,15). Dentro de este género se ha reportado que sus extractos muestran efectos anticonvulsivantes. Así, González-Trujano y colaboradores en el 2006, encontraron efecto

anticonvulsivante; tanto del extracto etanólico como del de la palmitona (aislada de la fracción de hexano) de la especie *Annona diversifolia*, tras realizar una evaluación tanto comportamental como electroencefalográfica (10).

Sin embargo, en otras especies los efectos anticrisis sólo han sido evaluados con la observación comportamental del animal en lapsos de tiempo cortos sin una evaluación electrofisiológica que permita caracterizar mejor su efecto sobre las crisis. En 2011, se reportó en Camerún un efecto anticrisis con *A. muricata*, cuando las crisis fueron inducidas con el pentilenetetrazol (PTZ), la estricnina y el N-methyl-D-aspartato (NMDA) (16). Adicionalmente, Hasrat et al. en 1997, ya había reportado interacción de tres alcaloides extraídos de *A. muricata* con el receptor 5-hidroxitriptamina_{1A} (5-HT_{1A}), lo que permite evidenciar efectos de dichos extractos en el sistema nervioso central (17).

Considerando lo anterior, en esta investigación se estudió el efecto anticrisis de la *A. muricata* presente en el occidente colombiano, la cuál es similar a las especies africanas y asiáticas, en las que se han reportado efectos anticrisis. En particular, se adelantó un estudio transversal evaluando *in silico* e *in vivo* el potencial anticrisis de los compuestos del extracto metanólico entero de *Annona muricata*.

Con este fin, se evaluó el efecto anticrisis de tres dosis del extracto metanólico entero de *Annona muricata*, mediante registro comportamental y electroencefalográfico con electrodos crónicos, a partir de crisis inducidas en ratas Wistar mediante inyección intrahipocampal de pilocarpina (PILO). Una vez terminados los experimentos electrofisiológicos, mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Parvalbúmina (anti-PV) se valoró el efecto neuroprotector del extracto; sobre el número de neuronas gabaérgicas que expresan PV en el hipocampo contralateral al inyectado con PILO. Complementariamente, nos hemos aproximado a evaluar la composición química del extracto empleado en nuestros experimentos mediante cromatografía de gases-masas (GC-MS). Igualmente, hemos hecho una revisión sistemática de compuestos químicos reportados en la literatura para estar presentes en *Annona muricata*. Las listas de compuestos obtenidas mediante análisis cromatográfico y por revisión sistemática se usaron para estudiar el acoplamiento molecular de estos compuestos con el sitio de unión extracelular de las benzodiazepinas en el receptor de ácido gamma-aminobutírico_A (GABA_A) $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, estableciendo la dinámica molecular de los compuestos con la mejores energías de acoplamiento molecular. Estos compuestos podrían explicar parcialmente los efectos anticrisis reportados en este trabajo y en la literatura.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EPILEPSIA

El desarrollo del “síndrome de epilepsia” implica un grupo de características clínicas que incluyen crisis similares, edad de inicio, hallazgos en electroencefalografía (EEG), factores desencadenantes, genética, historia natural, pronóstico y respuesta a antiepilépticos (18,19).

La epilepsia es una de las condiciones neurológicas más comunes, se estima que el 1% de la población mundial sufre de epilepsia y aproximadamente una tercera parte de los pacientes no responden a los tratamientos (epilepsia refractaria)(19).

1.1.1. Crisis epilépticas

Una crisis corresponde a la aparición transitoria de signos y síntomas debido a una actividad neuronal anormal excesiva o hipersincrónica en el cerebro (5,19). La mayoría de las crisis tienen una duración de pocos segundos a minutos y terminan por sí mismas. Estas se presentan debido a descargas eléctricas neuronales excesivas, sincronizadas de manera anormal, localizadas o ampliamente distribuidas que ocurren a través de cambios en la percepción sensorial, el control motor, el comportamiento o la función autonómica (18). Algunas crisis se encuentran precedidas por un aura, es decir, una crisis focal en la que el paciente está consciente y describe síntomas motores, sensoriales, autonómicos o psíquicos (19).

Las crisis se relacionan con un desbalance entre la excitación y la inhibición del cerebro. Este desbalance puede presentarse debido a alteraciones genéticas, de señalización subcelular o de circuitos neuronales (2,19). El inicio de las crisis se caracteriza por dos condiciones paralelas: 1) Desarrollo de potenciales de acción de alta frecuencia, y 2) Hipersincronización de una población de neuronas (18).

El desarrollo de potenciales de acción de alta frecuencia se encuentra relacionado con la actividad de la membrana neuronal, en donde se presenta un cambio en la carga de la membrana, debido a un ingreso de iones calcio (Ca^{2+}) extracelulares que conlleva al ingreso masivo de iones sodio (Na^{+}) debido a la apertura de canales de Na^{+} dependientes de voltaje (18), aumentando la excitación de la neurona. Por

otro lado, la hiperpolarización y la repolarización de la membrana neuronal se encuentran mediadas por el ingreso de iones cloruro (Cl^-) a través de canales mediados por el receptor del neurotransmisor GABA y la salida de iones potasio (K^+), lo que regula la inhibición neuronal. Es por esto, que parte de los tratamientos anticonvulsivantes evitan el catabolismo o recaptura de GABA aumentando la hiperpolarización y por tanto evitando el desarrollo de potenciales de acción de alta frecuencia (11,18); adicionalmente, este principio también es empleado para el desarrollo de modelos animales con epilepsia, en donde contrario al tratamiento, se emplean inhibidores de la síntesis de GABA, potencializando las crisis (18).

El GABA interactúa con dos tipos de receptores, el receptor GABA_A que corresponde al canal de Cl^- mencionado anteriormente y el receptor GABA_B que se encuentra relacionado con segundos mensajeros y atenúa la liberación de neurotransmisores por su ubicación presináptica (18).

Contrario a la relación del GABA con la epilepsia se encuentra la relación de glutamato con la misma, debido a que este último corresponde al principal neurotransmisor excitatorio del cerebro y un aumento del mismo puede llevar al desarrollo de crisis epilépticas (18).

El glutamato activa los receptores ionotrópicos de NMDA, de ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y de kainato, y los receptores metabotrópicos de glutamato, por lo tanto, un desbalance en la expresión de estos receptores puede conllevar al aumento de crisis epilépticas. Adicionalmente el glutamato tras la sinapsis es convertido rápidamente en glutamina por los astrocitos evitando su toxicidad y el desarrollo de los potenciales de acción de alta frecuencia mencionados, por lo que también un cambio glial ya sea en las células o en los transportadores de glutamato puede ser relacionado con el desarrollo de la enfermedad (18).

1.1.2. Tipos de crisis epilépticas

Las crisis epilépticas se dividen en tres categorías: generalizadas, focales o parciales y espasmos epilépticos. Las crisis generalizadas se distribuyen en redes neuronales bilaterales, mientras las focales se originan en una red neuronal limitada a una parte de un hemisferio cerebral. Una crisis puede inicialmente ser focal y después generalizarse. Adicionalmente, puede originarse en estructuras tanto corticales como subcorticales (2,19).

Empleando la anamnesis, los hallazgos EEG e información auxiliar se categorizan los tipos de crisis/epilepsia en subtipos generalizados y focales. Las crisis generalizadas se clasifican en crisis de ausencia, tónico-clónicas, mioclónica y atónicas. Las crisis de ausencia se caracterizan por una mirada fija del paciente sin respuesta a estímulos verbales externos. Por su parte, en las tónico-clónicas se producen movimientos simétricos bilaterales, con rigidez alternada por espasmo musculares en todas las extremidades, junto a un deterioro de la conciencia. En cuanto a las mioclónicas, estas consisten en movimientos repentinos y breves que no se asocian con cambios en la conciencia, y que pueden afectar uno o varios músculos, pudiendo ser tanto generalizadas como focales. Finalmente, las crisis atónicas implican pérdida del tono corporal, lo que resulta en caídas (19).

Por otro lado, en cuanto a las crisis focales, estas dependen del área de la corteza involucrada. Por ejemplo entre otras; si se originan en el lóbulo occipital, afectarán funciones visuales, en el giro precentral se alterará la actividad motora, y en el giro postcentral se afectará la actividad sensorial (19). Adicionalmente, en cuanto a los espasmos epilépticos, estos son de origen incierto y se manifiestan como extensiones o flexiones de las extremidades, que se repiten en ráfagas (19).

Adherido a ello, cuando se presentan crisis consecutivas sin recuperación entre ellas, se produce el “Status Epilepticus” (SE), un periodo de alta actividad convulsiva que involucra crisis tónico-clónicas generalizadas y descargas eléctricas continuas. Este estado se asocia a una alta mortalidad, constituyendo un problema importante de la salud pública (2).

1.2. MODELOS MURINOS DE EPILEPSIA

Los modelos murinos de epilepsia, permiten a través del estudio del daño agudo inducido, el periodo de latencia de las crisis (intervalo de tiempo libre de crisis después de la lesión convulsivante) y las crisis espontáneas de la fase crónica; la comprensión de la fisiopatología, el reconocimiento de las estructuras cerebrales involucradas en la epileptogénesis y la identificación y mecanismos de acción de nuevos fármacos y/o moléculas con efectos antiepilépticos (2,20).

Entre los diferentes tipos de crisis/epilepsia, la epilepsia del lóbulo temporal corresponde a la más frecuente, constituyendo cerca del 60% de los casos y siendo

una en las que se presenta mayor resistencia a los tratamientos, razón por la cuál es una de las más estudiadas y constituye el principal tipo de modelo murino de epilepsia empleado en investigaciones(2). El foco de este tipo de crisis se presenta principalmente en el sistema límbico ya sea en el hipocampo, la corteza entorrinal o la amígdala (2,21), con una alta incidencia de esclerosis mesial o del Cuerno de Amón (CA), en donde se presenta una lesión hipocampal unilateral que conduce a la atrofia por pérdida neuronal y gliosis en la transición del subículo-CA1 y el hilus (21).

Los modelos de pilocarpina y kainato, producidos con inyección intraperitoneal de cualquiera de los dos quimioconvulsivantes replican características de la epilepsia del lóbulo temporal que permiten su uso para entender los mecanismos de la epileptogénesis, a través de la producción de SE por hiperexcitabilidad neuronal crónica con crisis y daño en el hipocampo, amígdala y corteza entorrinal. Sin embargo los efectos autonómicos de las sustancias suelen producir una alta mortalidad en los animales empleados (2,20).

1.2.1. Modelo murino de epilepsia hipocampal

La inyección intrahipocampal de una baja concentración de los quimioconvulsivantes pilocarpina o kainato produce pérdida de neuronas hipocampales, de manera similar a la presentada en pacientes con esclerosis hipocampal (2), junto a una baja mortalidad de animales tras la inyección, razón por la cual constituyen modelos altamente empleados en investigación.

En 2002 Furtado y colaboradores emplearon una inyección de 1µl a una concentración de 2,4mg/µl en el hilus, logrando la inducción de SE sin mortalidad, con presencia de crisis espontáneas similares; tanto en los cambios morfológicos como en los electroencefalográficos, a las observadas en animales con inyección intraperitoneal, lo que hace a este un buen modelo para la evaluación de compuestos con potencial anticrisis (22).

1.2.2. Interneuronas GABAérgicas hipocampales y técnicas de marcaje inmunohistoquímico.

La corteza cerebral está compuesta por redes neuronales que funcionan a través de un balance entre excitación e inhibición. A nivel celular estas redes están formadas por neuronas de proyección excitatorias e interneuronas inhibitorias que usan principalmente como neurotransmisores el glutamato y el GABA, respectivamente (23–25). Las interneuronas inhibitorias constituyen entre el 25 y el 30% de las neuronas corticales, jugando un papel importante en la modulación de las señales corticales (24), lo que hace que el estudio de los cambios en su presencia o su funcionamiento sea una fuente importante de información sobre la acción de sustancias con potencial neuroprotector.

Una forma de estudio de las neuronas mencionadas es a través del reconocimiento de moléculas expresadas en cada tipo de neurona. Es así como se ha establecido que las interneuronas GABAérgicas pueden dividirse en subgrupos neuroquímicos según la expresión de PV, somatostatina (SST), Calretinina (CR), neuropéptido Y, péptido intestinal vasoactivo (VPI), colecistoquinina, Calbindina (CB) (Figura 1) (23–25).

En el hipocampo las interneuronas inhibitorias mejor descritas son las perisomáticas (con proyecciones axónicas hacia el soma o las dendritas proximales) y las axoaxónicas (con proyecciones hacia los segmentos axonales iniciales. Dentro de ambos grupos en CA1, CA2 y CA3 la mayoría expresan PV, con ubicación de sus somas en los estratos oriens y piramidal (25,26), lo que resulta en un marcador importante para el reconocimiento de la acción GABAérgica en el hipocampo.

Adicionalmente la correspondencia entre resultados inmunohistoquímicos, la hibridación de ARNm in situ y los inmunoensayos en la localización de neuronas GABAérgicas con expresión de proteínas de unión a calcio, posiciona la inmunohistoquímica como una herramienta confiable para el estudio de dichas células (27).

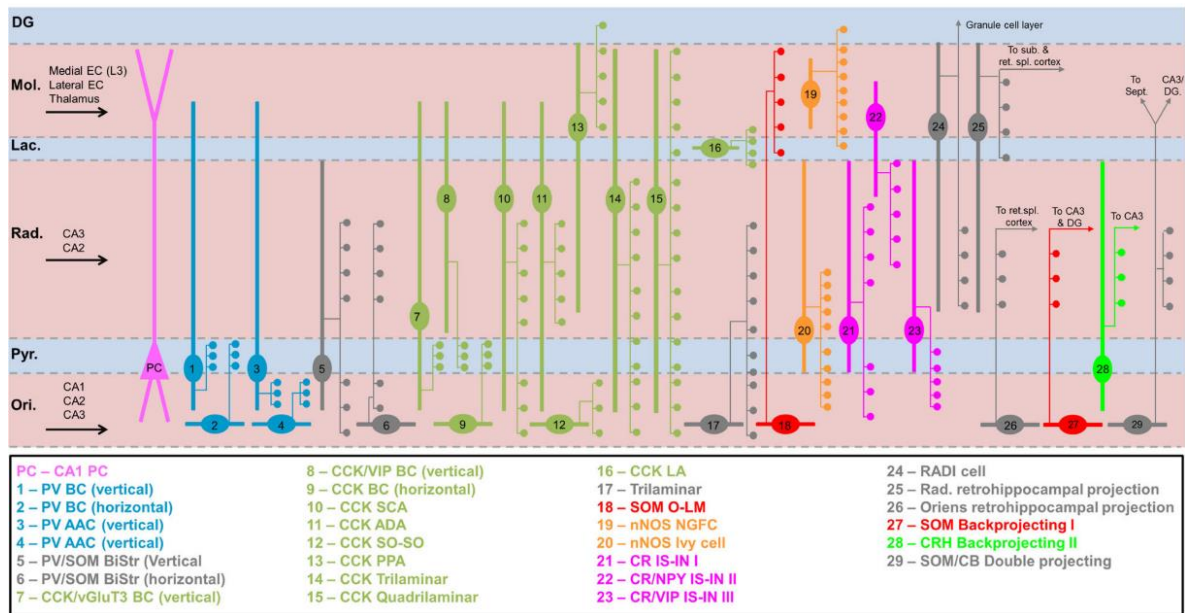


Figura 1. Distribución de interneuronas en hipocampo. Capas: Ori, estrato oriens; Pyr, estrato piramidal; Rad, estrato radiado; Lac, estrato lacunoso; Mol, estrato molecular; DG, giro dentado (26).

1.2.3. Sistemas de registro electrofisiológico en modelos murinos de epilepsia

Los sistemas de registro electrofisiológico emplean al menos dos conductores para medir la diferencia de potencial, un medio para amplificar la diferencia y un método para almacenar las señales a lo largo del tiempo. Los diseños experimentales actuales permiten registrar con precisión la actividad nerviosa en tiempo real. Todos los sistemas emplean los mismos componentes para el registro de información (Figura 2) (28).

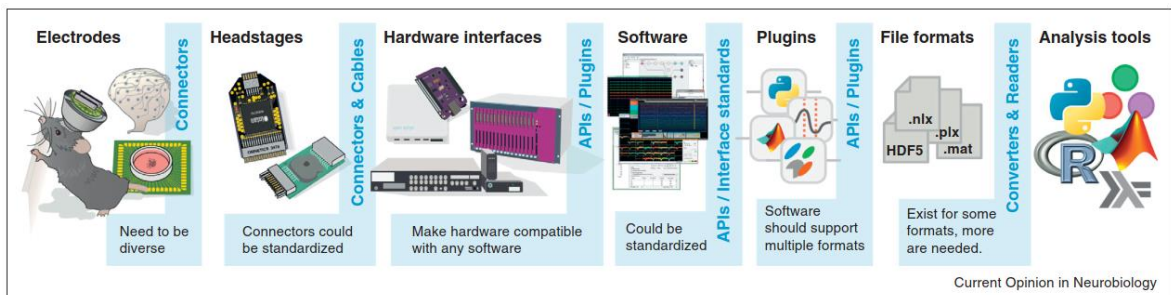


Figura 2. Componentes de registro de información electrofisiológica (28)

Entre los sistemas de registro la electroencefalografía (EEG) ha sido una técnica empleada para caracterizar crisis y patrones electrográficos para el diagnóstico y tratamiento de desórdenes epilépticos, lo cual la ha convertido en una técnica importante en la investigación preclínica en roedores, para evaluar los efectos de la hipoxia, de las crisis epilépticas del lóbulo temporal y del daño por trauma cerebral, entre otros. Adicionalmente el registro con video de manera continua ha sido esencial como modelo para estudiar la historia natural de enfermedades humanas (29).

La video-EEG permite capturar a través de video los comportamientos y movimientos del animal al mismo tiempo que se realiza el registro encefalográfico, permitiendo correlacionar la información comportamental con las señales obtenidas en el EEG (30).

1.3. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA EPILEPSIA

La mayoría de los medicamentos anticrisis actúan disminuyendo la actividad eléctrica del cerebro ya sea bloqueando los canales iónicos de Na^+ o Ca^{2+} dependientes de voltaje u optimizando la actividad del GABA como neurotransmisor, sin embargo, un gran número de tratamientos presentan mecanismos de acción desconocidos (Tabla 1) (8,18,19,24). Cabe mencionar por ejemplo, que es común encontrar una disminución de receptores de GABA en tejidos de recesión quirúrgica provenientes de pacientes con epilepsia (24).

Los avances en neurobiología han introducido nuevas vías farmacológicas como receptores de cannabinoides, serotonina, melatonina y galanina. Adicionalmente también han aparecido agentes que modifican el curso de la epilepsia, como es el caso de la modificación de la neuroinflamación con el antibiótico minociclina (8,11).

Por otro lado, el Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa en los Estados Unidos, considera la existencia de una medicina complementaria y alternativa (CAM) que incluye prácticas, productos y atención médica no convencional y reconoce cuatro dominios de prácticas: 1) medicina de la mente y cuerpo (meditación, oración, curación mental, arte, música y danza); 2) prácticas de base biológica (uso de sustancias que se encuentran en la naturaleza, como hierbas, alimentos, vitaminas y compuestos animales); 3) manipulación y prácticas

corporales (quiropaxia, masajes); y 4) medicina energética (terapias de biocampo y electromagnéticas). Aunque se conocen beneficios en el empleo de la CAM aún existe un campo amplio para investigaciones futuras al respecto (6).

Tabla 1. Mecanismo de acción de medicamentos usados como antiepilépticos (19)

Mecanismo	Fármaco antiepiléptico
Bloqueo de la activación repetitiva de canales de sodio	Fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, topiramato.
Mejoramiento de la inactivación lenta de canales de sodio	Lacosamida, rufinamida.
Mejoramiento de la actividad de receptores GABA _A	Fenobarbital, benzodiazepinas, clobazam.
Bloqueo de receptores NMDA	Felbamato.
Bloqueo de receptores AMPA	Perampanel, topiramato.
Bloqueo de canales de calcio tipo T	Etosuximida, valproato.
Bloqueo de canales de calcio tipo N y tipo L.	Lamotrigina, tipiramato, zonisamida, valproato.
Moduladores de corrientes hiperpolarizantes (H)	Gabapentina, lamotrigina
Bloqueadores de sitios de unión únicos	Gabapentina y levetiracetam
Inhibidores de anhidrasa carbónica	Topiramato, zonisamida
Estimulación de la apertura de canales de potasio (KCNQ, Kv7)	Retigabina
Inhibidores de GABA transaminasa	Vigabatrin
Inhibidores de la recaptura de GABA	Tiagabina

1.3.1. Tratamientos anticonvulsivantes naturales

Desde la antigüedad, se han utilizado las brebajes vegetales en la medicina popular para el tratamiento de diversas enfermedades, esto debido a que las plantas son la fuente más importante de compuestos biológicamente activos (12,31).

Algunos de estos brebajes presentan compuestos que constituyen un recurso químico y biológico con alta actividad anticrisis epiléptica, y muchos de ellos no son de fácil síntesis química, por lo que se ha optado por estudiar sus extractos enteros y fraccionados con el fin de conocer su potencial anticrisis. En algunos casos se

conocen sus mecanismos de acción, otros aún son una fuente importante de desarrollo de nuevas terapias farmacológicas naturales (18). De estos compuestos naturales, los más empleados son extractos de plantas, que pueden derivarse de hojas, flores, raíces, corteza, frutas, semillas o tallos, que generalmente se usan para la elaboración de infusiones, decocciones, tabletas, cremas y pomadas (13).

No obstante, los extractos más empleados son los producidos a partir de hojas, esto debido a que, aunque los compuestos bioactivos se almacenan como metabolitos secundarios en toda la planta, las hojas son los mayores acumuladores de dichos compuestos entre todos los órganos de la planta (12).

En Asia y África se han desarrollado diversas investigaciones con el fin de establecer el potencial farmacológico de las plantas empleadas en la medicina tradicional, muchas de ellas presentes también en Latinoamérica, sobre todo en aquellos países ubicados en los mismos paralelos, y en donde muchas de estas plantas fueron introducidas durante la conquista y la colonia. A partir de estas investigaciones se ha encontrado un efecto anticrisis epilépticas en plantas como *A. muricata* (16,32) y *A. cherimolla*, en la cual se ha reportado la presencia de ácido kaurenoico (33,34). Estas plantas se encuentran también en Colombia. Adicionalmente, la evaluación de la actividad anticrisis es determinada principalmente a través del comportamiento y el empleo de electroencefalografía en modelos animales con inducción de crisis epilépticas (5).

Es así, como en 2011 en Camerún se llevó a cabo un estudio evaluando el potencial antiepiléptico de plantas empleadas en la medicina tradicional de dicho país, a través de la evaluación de su efecto anticonvulsivante en ratones divididos en cinco grupos, cada uno evaluado con un convulsivante químico diferente; encontrando efectos anticonvulsivantes en *A. muricata* cuando se emplean como convulsivantes el PTZ (crisis clónica), la estriknina y el NMDA (16).

1.3.1.1. *Annona muricata*

El género *Annona* es uno de los 129 géneros de la familia Annonaceae (15), que comprende más de 119 especies (12,14,15). La mayoría crecen en regiones tropicales como el oeste de la India, norte y Suramérica, África, islas del Pacífico y el sureste de Asia (14,15). 109 de estas especies son nativas de América tropical (12,14).

Las especies de este género han sido empleadas por los indígenas para tratar diversas enfermedades incluyendo infecciones por parásitos, inflamación, diabetes y cáncer. Las investigaciones fitoquímicas en este género han mostrado presencia de acetogeninas, alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, terpenoides, entre otros, aunque aún hay limitación en la información de sus componentes activos (14,15).

Las acetogeninas son el principal constituyente (cerca del 90%) de los extractos de plantas del género *Annona* y se han encontrado diversas actividades farmacológicas (15,31,35) que incluyen: actividad antitumoral, inmunosupresora, pesticida, antiprotozoaria, antimicrobiana, antimalárica, antihelmíntica y antiviral (14,15). En *A. muricata* se han reportado 127 compuestos entre hojas, frutos semillas y raíz, de los cuales un 86% corresponden acetogeninas y un 14% a alcaloides (15).

Las acetogeninas han sido relacionadas con un efecto anti-proliferativo en el cáncer, debido a que promueven la citotoxicidad afectando procesos de generación de adenosín trifosfato (ATP) y oxidación de nicotianamina adenina dinucleótida (NADH) y de esta manera el metabolismo celular (35).

Dentro de los alcaloides encontrados en *A. muricata*, annonaina, asimilobina y nornuciferina han sido reportados como antidepresivos al participar en la inhibición de la recaptura de dopamina y se agonistas del receptor 5-HT1A de serotonina (17,36–38).

Entre todas las especies de *Annona*, *A. muricata* es reconocida por ser usada ampliamente en decocciones tradicionales en 35 países diferentes. Entre sus usos se encuentran tratamientos contra la hipertensión, la diabetes mellitus, enfermedades parasitarias, reumáticas, inflamatorias, respiratorias, digestivas, urinarias, cutáneas, espasmódicas y cancerígenas (15,31,38,39).

Dado su alto contenido en antioxidantes con potenciales efectos protectores sobre la salud, el té de guanábana, obtenido de sus hojas secas, se comercializa efectivamente como complemento alimenticio (12)(15).

1.3.2. Receptor GABA_A como blanco farmacológico

Los receptores de GABA han sido usados como blancos farmacológicos para moléculas con acción anticrisis epilépticas, debido a la acción de GABA como neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (40). Dentro de sus receptores, GABA_A es reconocido como el principal mediador de la neurotransmisión inhibitoria rápida en el cerebro debido a su carácter ionotrópico, que permite el paso de iones cloruro a través de la membrana plasmática, ocasionando hiperpolarización (18). Por lo tanto, compuestos con actividad potencial sobre este receptor son de interés farmacológico, en términos de la posibilidad de modular el sistema nervioso central (40).

El receptor GABA_A se encuentra formado por un pentámero del cuál, a la fecha, se han descrito 19 posibles subunidades (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π , y ρ 1–3). En el cerebro el pentámero se encuentra formado principalmente por dos subunidades α , dos β y una γ o δ (40).

Existen múltiples sitios de unión farmacológica reconocidos en el receptor GABA_A, en donde algunos fármacos potencializan y otros disminuyen la acción de GABA. Dentro de estos, se encuentran los sitios de modulación alostérica positiva como el de alta afinidad de las benzodiazepinas, localizado en el dominio extracelular (ECD) del receptor, que además es el mejor caracterizado (40).

En el grupo de las benzodiazepinas, el diazepam ha sido ampliamente estudiado encontrando diferencias en su acción dependiendo de las subunidades que conformen al receptor de GABA_A, donde, sí las subunidades incluyen: α 1, su acción es principalmente sedativa o anticrisis epilépticas; α 2, ansiolítica, α 2, α 3 y α 5, relajante muscular; y α 1 y α 5, amnésica y discapacitante cognitiva (40,41). Es por esto, que el pentámero α 1 β 2 γ 2, que es el más abundante en el cerebro (42) es un buen blanco farmacológico para la evaluación de potenciales fármacos antiepilépticos.

1.4. ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTICRISIS

Los métodos computacionales como la dinámica molecular, el modelo de farmacóforo, el acoplamiento (docking) molecular, y el “machine learning” pueden

ser usados como un filtro complejo para conocer posibles moléculas que puedan actuar como fármacos, reduciendo la cantidad de ligandos (posibles fármacos) probados en experimentos *in vivo* e *in vitro* (43,44).

1.4.1. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular permite predecir la conformación de un complejo de ligando-proteína (sitio de acción) y la afinidad de su unión (45). La estructura proteica es empleada como objetivo (target) para la unión (dock) de ligandos a un sitio de unión proteico y así estudiar sus interacciones intermoleculares (46).

Esta técnica combina dos procesos: primero genera varias conformaciones tridimensionales del ligando, evaluando el espacio conformacional de este; posteriormente define la afinidad de la unión proteína-ligando, de acuerdo a las poses del ligando, estableciendo puntuaciones (scoring) de acuerdo a la energía más negativa (Kcal/mol)(45).

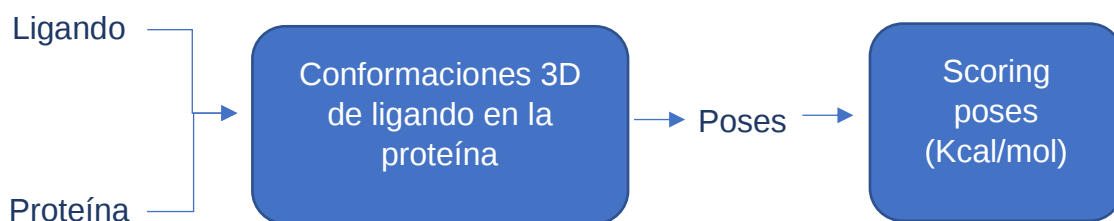


Figura 3. Procesos desarrollados durante el acoplamiento molecular.

1.4.2. Dinámica molecular

Si bien, el acoplamiento molecular permite establecer las poses de unión con mayor afinidad a través de los “scores” de energía, siendo flexible en cuanto a la evaluación de diferentes estructuras, este no permite evaluar los cambios conformacionales que se pueden presentar a través del tiempo en las proteínas, cambios que sí son evaluados en la dinámica molecular (47).

La dinámica molecular permite establecer como cambios conformacionales de nano o microsegundos que se presentan constantemente en las proteínas y afectan la

estabilidad de la unión (48,49). Además, esta se realiza en un sistema que emula las condiciones fisicoquímicas como presión, temperatura y concentración de la solución (50).

Adicionalmente, la dinámica molecular emplea campos de fuerza que describen la dependencia energética de un sistema en todas las coordenadas de sus partículas, permitiendo explicar la interacción entre los átomos presentes en el sistema, a través del cálculo de la energía potencial que permite la funcionalidad proteica (48,51,52).

La dinámica molecular es analizada a través de diferentes parámetros que incluyen el RMSD y Rgyr. El RMSD o desviación cuadrática media, es la desviación observada entre dos átomos, la cual permite predecir la estabilidad de la proteína. Sus gráficos explican las posibles variaciones en cuanto al plegamiento proteico a lo largo de la simulación, permitiendo comparar efectos mutacionales o de unión del ligando. En cuanto al Rgyr o radio de giro, corresponde a la distribución de átomos de una proteína alrededor de su eje, y se mide como la distancia entre el punto que gira y el punto donde la transferencia de energía tiene efecto máximo (48).

2. ANTECEDENTES

Las especies del género *Annona* han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, ya sea empleando sus hojas, raíces, fruto, o semillas. Dentro de sus usos se encuentran las decocciones de sus hojas como anticonvulsivantes, antidepresivas y antinociceptivas.

A partir de las observaciones de empleo en medicina tradicional de la planta, investigadores como Hasrat y colaboradores en 1997, evaluaron la actividad de extractos crudos etanólicos de plantas del género *Annona* obtenidas en Surinam, con el receptor 5-HT_{1A}, a través de la inhibición de la unión del receptor a [3H] rauwolscina, encontrando afinidad por el receptor en los alcaloides de isoquinólicos: asimilobina, nornuciferina y annonaina, extraídos de *A. muricata* (17,36), lo que permite asociar estos extractos a efectos antinociceptivos.

Igualmente, Roslida y colaboradores en 2010 y 2012 evaluaron el efecto antinociceptivo del extracto de hojas de *A. muricata* colectadas en Malasia. El extracto fue suspendido en vehículo de tween 80 al 1% en dosis de 10, 30, 100 y 300mg/kg de peso y suministrados oralmente previo a la realización de las pruebas de formalina subcutánea en ratas, ácido acético y placa caliente en ratones encontrando una actividad nociceptiva significativa, obteniendo la mejor respuesta con la dosis más alta empleada (38,39).

En 2011, en Camerún se reportó un efecto anticonvulsivante de extractos acuosos de *A. muricata*, inyectando dosis de 12, 30, 60 y 120mg/Kg en *mus musculus Swiss* una hora antes de la inyección de los medicamentos productores de crisis; el pentilenetetrazol (PTZ), la estricnina y el N-methyl-D-aspartato (NMDA), encontrando ausencia de crisis en los animales inyectados con los tratamientos, versus los animales no tratados (16).

Adicionalmente, en otras especies del género *Annona* como *A. diversifolia* se ha evaluado electrofisiológica y comportamentalmente el efecto anticonvulsivante tanto de la inyección intraperitoneal del extracto etanólico (30mg/kg) como del de la palmitona (aislada de la fracción hexánica, 10mg/kg), ambos obtenidos de hojas. Este trabajo se llevó a cabo en ratas Wistar implantadas con dos electrodos, uno con cánula ubicado en el núcleo central de la amígdala y un segundo electrodo sin cánula en el hipocampo dorsal. Las convulsiones fueron producidas por la inyección

de penicilina G (100UI/ μ L) a través de la cánula amigdalina. Se encontró un retraso en el tiempo de latencia para el desarrollo de convulsiones conductuales y electroencefalográficas, tanto con el uso del extracto etanólico como del de la palmitona (10).

Debido a las posibles acciones farmacológicas de los extractos obtenidos de *A. muricata*, la composición de los mismos ha sido caracterizada encontrando 212 compuestos distribuidos entre alcaloides, acetogeninas, fenoles, entre otros (53). Dentro de estos las principales acciones farmacológicas evaluadas han sido dirigidas a la terapia de cáncer por lo que los principales reportes son efectos citotóxicos. En cuanto a acción sobre el sistema nervioso central se han reportado acciones antidepresivas de los compuestos Annonaina, Asimilobina, Nornuciferina, por acción en el receptor 5-HT_{1A} (17,36,53). Sin embargo, es escasa la información sobre los posibles compuestos asociados a las acciones anticonvulsivantes de los extractos obtenidos a partir de *A. muricata*.

Actualmente una forma de evaluar el posible efecto anticrisis de los compuestos derivados de extractos de *A. muricata*, es emplear métodos computacionales que permitan ver la afinidad de sus compuestos sobre blancos farmacológicos asociados al desarrollo y o control de las crisis. Uno de ellos son los receptores de GABA. De hecho, el receptor GABA_A, ha sido explorado farmacológicamente por su carácter ionotrópico con una rápida activación inhibitoria, encontrando diversos sitios de unión de fármacos importantes para el tratamiento de la ansiedad, el insomnio, las crisis epilépticas, el dolor y las respuestas anestésicas (40,42,54,55).

Estudios estructurales del receptor GABA_A más abundante en el cerebro, formado por las subunidades $\alpha 1\beta 1\gamma 2$, muestran cinco sitios de unión con interés farmacológico que incluyen: el sitio de unión del neurotransmisor GABA, dos sitios de unión transmembrana de las benzodiazepinas, el sitio de unión transmembrana de los anestésicos generales y el sitio de unión de alta afinidad de las benzodiazepinas extracelular. Este último, es importante en la producción de efectos anticrisis del diazepam (40,54).

Computacionalmente, usando la técnica de acoplamiento molecular Sahila y colaboradores en 2015 evaluaron 61 compuestos derivados de plantas en el homopentámero del receptor GABA_A formado por las subunidades $\beta 3$, sobre el sitio de unión de la benzamidina, explorando posibles acciones antipsicóticas de los compuestos evaluados (56). Sin embargo, este homopentámero no es muy semejante a los receptores con función fisiológica. Posteriormente Álvarez y Pecci

en 2018 determinaron a través de acoplamiento molecular y dinámica molecular cinco bolsillos transmembrana para neuroesteroides presentes en el receptor formado por las subunidades $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (57).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos anticrisis y neuroprotectores del extracto metanólico completo de las hojas de *Annona muricata* y analizar el acoplamiento molecular de sus metabolitos secundarios en el sitio de unión extracelular de benzodiacepinas del receptor GABA-A.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 3.2.1. Evaluar los efectos anticrisis y neuroprotectores del extracto metanólico completo de las hojas de *Annona muricata* en un modelo experimental de PILO-SE en ratas.
- 3.2.2. Analizar el acoplamiento molecular de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico completo de las hojas de *Annona muricata* en el sitio de unión extracelular de benzodiacepinas del receptor GABA-A.
- 3.2.3. Analizar el acoplamiento molecular de metabolitos secundarios de *Annona muricata* en el sitio de unión extracelular de benzodiacepinas del receptor GABA-A.

4. CAPÍTULO 1

Evaluación de los efectos anticrisis y neuroprotectores del extracto metanólico completo de las hojas de *Annona muricata* en un modelo experimental de PILO-SE en ratas.

4.1. METODOLOGÍA

4.1.1. Tipo de estudio, población y muestra

Esta tesis hace parte de la convocatoria interna de la Universidad del Valle del 2019, bajo el proyecto con C.I. 5314 con el acta de aval del Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación 002019 del 05 de julio de 2019; para su desarrollo se adelantó un estudio de tipo transversal. Se utilizaron un total de 49 ratas Wistar macho de 250 a 300 g de peso resolución. Se realizó prueba de toxicidad para determinar la dosis letal 50 ($n=18$), empleando los protocolos de OECD (58). Para ello se organizaron 6 grupos de 3 ratas, con cada uno de los cuales se ensayó una dosis específica. Para los experimentos de video-electroencefalografía e inmunohistoquímica con PV se emplearon 31 biomodelos divididos en 4 grupos de 7 ratas cada uno, en los cuales se ensayaron las siguientes dosis: 0 (vehículo + PILO), 1/5, 1/10 y 1/20 de la dosis letal 50 del extracto entero metanólico de las hojas de *A. muricata*, el cual fue ensayado en un modelo de estatus epiléptico inducido por pilocarpina (PILO) intrahipocampal. Un quinto grupo de control ($n=3$) sin ningún tipo de tratamiento fue empleado solamente para los análisis inmunohistoquímicos.

Para el cálculo de la muestra se empleó la fórmula que se presenta a continuación, con un nivel de confianza de 95% ($K=1,96$), un error muestral deseado del 5%, una presunción de 0,5 para la variación entre las poblaciones (asumiendo un control y un tratamiento) y un N poblacional como el mínimo necesario para la obtención significativa de resultados (14), encontrando un valor de $n=14$, es decir 7 animales por grupo, lo cual coincide con lo reportado por Sócrates et al. (59) donde lo considera el mínimo valor para obtener diferencias significativas entre grupos.

$$n = \frac{k^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{(e^2 \cdot (N-1)) + k^2 \cdot p \cdot q}$$

Todos los experimentos con animales se realizaron a 25°C, humedad relativa entre el 45-55%, y 12 h de luz/oscuridad por ciclo de 12 h y niveles de ruido menores a 70 decibeles. Los animales recibieron alimento y agua durante toda la fase experimental y en los periodos de descanso entre los protocolos experimentales permanecieron en el bioterio de la Universidad del Valle, con el fin de minimizar su estrés.

4.1.1. Preparación del extracto entero metanólico de *Annona muricata*

Se colectaron 500 g hojas de *A. muricata* en Santiago de Cali- Colombia (3°22'30"N 76°32'04"O). El material vegetal que se colectó fue secado a 60° C durante 72 h. Completamente seco, se pulverizó con un mortero y el pulverizado obtenido se suspendió en 2500 ml de agua destilada, se llevó a una temperatura de 100°C y se agitó por una hora, luego se adicionó un volumen igual al sobrante de metanol grado analítico. Posteriormente se dejó suspendido el material en la mezcla agua:metanol 1:1.

Luego de 24 horas la suspensión fue filtrada al vacío en un microfiltro Millipore de 0,22 µm para descartar detritos sólidos. La muestra filtrada se concentró en un Rotovap a 50° C hasta obtener el secado del extracto. Finalmente, el material secado en Rotovap, se centrifugó a presión reducida por medio de un SpeedVac para obtener un mayor secado de la muestra del extracto entero.

4.1.2. Determinación de dosis letal 50 (DL50)

La determinación de la dosis letal 50 se realizó siguiendo los protocolos de OECD, empleando cinco concentraciones de prueba (5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg, 2000 mg/Kg y 5000 mg/Kg), la dosis inicial fue de 300 mg/Kg, tomándola como concentración media (Figura 4) (58). Todos los extractos fueron aplicados en el animal por inyección intraperitoneal, empleando una disolución del extracto entero en el vehículo: solución salina 0,9%, tween 80 y etanol 96% (92:6:2).

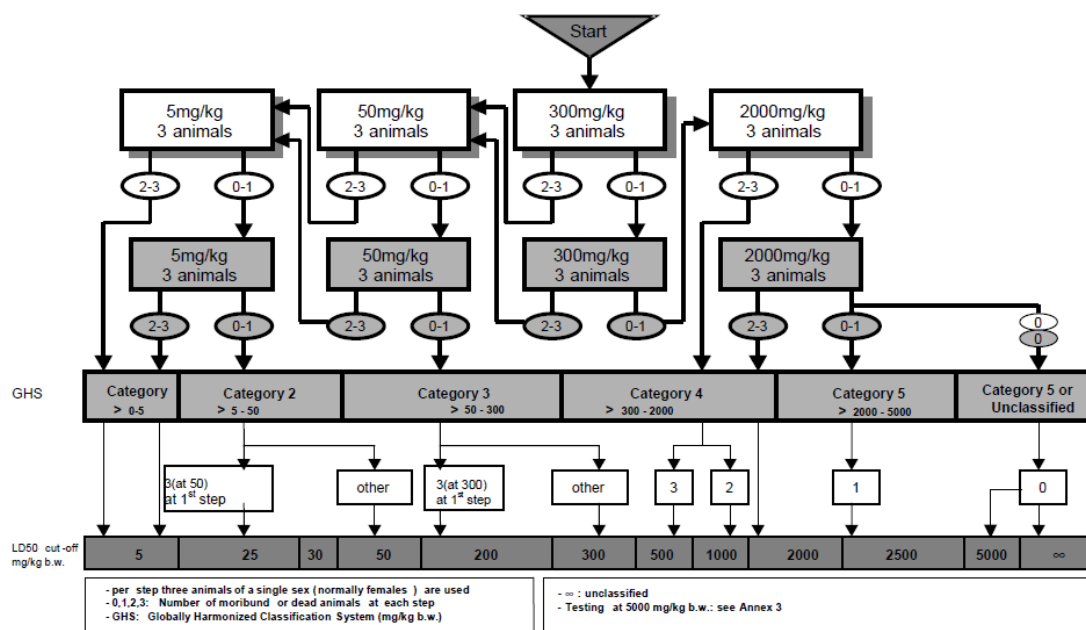


Figura 4. Protocolo OECD para la determinación de dosis letal 50 con inicio en dosis 300 mg/Kg

4.1.3. Video-encefalografía y estatus epiléptico con pilocarpina

Se realizó video - electroencefalografía (EEG) mediante la inserción de un electrodo con cánula de ubicación profunda y para registro crónico (Figura 5). El electrodo fue insertado 7 días antes a la inducción de las crisis con pilocarpina (PILO). Para ello los ratones recibieron anestesia con ketamina y xylazina intraperitoneal y mediante cirugía guiada por marco estereotáxico, se implantó el electrodo de registro específicamente en el hipocampo dorsal izquierdo y la cánula para la administración de pilocarpina fue insertada 1 mm superior a este. Dichos electrodos fueron conectados al sistema de registro. La adquisición de datos se realizó con el hardware *PowerLab ADInstruments*, usando el software *LabChart Pro 8.0*, con una tasa de muestreo de 2 KHz, un rango de 10 mV, un filtro pasa bajo de 1 KHz y un notch de 60 Hz.

La actividad eléctrica y el comportamiento de los animales despiertos fueron registrados 7 días después de la cirugía, con tres tipos de registros: inicialmente 30 minutos de registro base; posteriormente se realizó la inyección intraperitoneal de la dosis del extracto o vehículo y se efectuó un registro de 30 minutos; y finalmente se inyectó la pilocarpina (0,6mg/μL) y se hizo un registro de 90 minutos posteriores, para evaluar la presencia de crisis según la escala de Racine (60) (tabla 2) y el

registro electroencefalográfico. Pasado este tiempo, si se presentaron crisis, las mismas fueron detenidas con la inyección de Diazepam (5 mg/Kg).

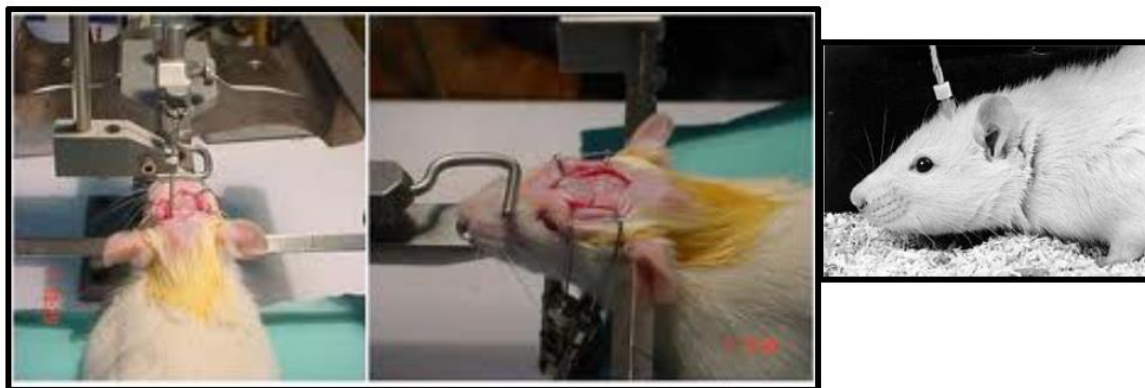


Figura 5. Implantación de electrodos de registro bajo marco estereotáxico.

Se identificó la ocurrencia de las crisis tanto en el comportamiento motor como en el EEG. Los videos de la actividad motora fueron sincronizados con las señales del EEG, y a partir de estos se evaluaron los parámetros comportamentales de la escala de Racine (60), adicionando una etapa 0 de no crisis, más la presencia de sedación, temblores finos y fuertes, salivación y piloerección tomados del test comportamental de Irwin (61); para ello se establecieron 5 ventanas de 2 minutos durante los 30 minutos posteriores a la inyección de pilocarpina donde se evaluaron los parámetros ya mencionados.

Tabla 2. Escala modificada de Racine (60)

Etapas	Comportamiento
0	Sin crisis
1	Movimientos orofaciales
2	Oscilaciones de la cabeza
3	Clonus de patas anteriores
4	Extensión del dorso
5	Pérdida del balance y caída

Adicionalmente a partir de los datos obtenidos se analizó la latencia tanto comportamental como electroencefalográfica entre la aplicación de la PILO y la presentación de la crisis. La comportamental se evaluó a través de la determinación del tiempo en que se tarda la presentación de cada etapa de Racine tras la inyección de PILO, mientras la electroencefalográfica a través de la primera señal característica de crisis presentada después de la inyección de PILO.

En cuanto a las señales de EEG, el registro de cada animal generó un archivo de medición continua con un único canal de registro o señal en formato .mat. Cada señal se dividió en tres fases, que fueron; (1) los tiempos de control, (2) de tratamiento (inyección de vehículo o del extracto con su respectiva dosis) y (3) de pilocarpina. Dentro de cada una de estas fases se seleccionó un tiempo de 120 segundos, que iniciaron en los tiempos control y tratamiento a los 120 segundos, y que se identifican en el análisis con los momentos 1 y 2 respectivamente; y finalmente, en el tiempo luego de la aplicación de la PILO una vez terminada la latencia.

Después, se analizaron cada uno de estos tiempos seleccionados utilizando el lenguaje de programación Python en su versión 3.9, por medio del entorno informático de jupyter notebook. Para esto, primero se importaron los paquetes scipy, pylab, numpy, ssqueezepy, seaborn, scaleogram, pywt, os, itertools, pandas, collections. Luego se montaron los datos a analizar realizando la selección del tiempo correspondiente. Seguidamente, se realizaron medidas estadísticas para confirmar el intervalo de muestreo, definiendo el total de puntos a analizar, además de calcular la media estadística, la varianza y la desviación estándar de dichos puntos. Posteriormente, se realizó una medida de la autocovarianza, la cual proporcionó la covarianza de la señal consigo misma en pares de puntos de tiempo, permitiendo observar una primera aproximación al comportamiento de dichos datos. Tras terminar la revisión de datos se realizó una transformada rápida de Fourier, con la cual se obtuvieron las potencias espectrales de las frecuencias comprendidas entre los 1 a 15Hz. Por último, se realizó una transformada wavelet utilizando la wavelet morlet, graficando un escalograma que permitió ver la variación de frecuencias en función del tiempo.

4.1.4. Evaluación de neuroprotección

La evaluación de la neuroprotección se llevó a cabo con el análisis morfológico de células PV+ presentes en las áreas de corteza cerebral, CA1, CA3 e hilus. Para ello,

pasados 7 días de la video-EEG, los animales se indujeron bajo anestesia (isoflurano 4%) para perfusión y extracción del encéfalo de la siguiente manera: perfusión intracardiaca con suero salino (Cloruro sódico al 0,9% en H₂O); seguidamente, de perfusión con paraformaldehído al 2%, lisina HCl al 1,5% y metaperiodato de sodio al 0,2% en tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 (PLP). Los cerebros extraídos se posijaron en PLP durante 48 h a 4°C. Posteriormente, se cortaron en secciones de 30 µm de espesor en vibrátomo (Leica VT1200S), tomando de referencia para inicio de los cortes la localización del electrodo, realizando un total de 3 cortes por cerebro. Con estos cortes se procedió a la tinción inmunohistoquímica, con el anticuerpo primario PV (el protocolo de tinción se presenta en el anexo 1).

Por cada animal se produjo una placa con tres cortes, la cual fue empleada para la toma de tres microfotografías por corte en microscopio óptico a 10X y 40X (Zeiss acoplado a AxioCam HRc) en las regiones corteza cerebral dorsolateral, CA1, CA3 e hilus. Con la ayuda del software ImageJ® (NCBI), se determinaron en cada una de las regiones los siguientes parámetros morfológicos; (1) densidad celular, (2) área de soma celular, (3) número de procesos primarios y (4) forma del soma de las células parbalvúmina positivas (PV+).

4.1.5. Análisis estadístico

Los parámetros comportamentales se evaluaron por estadística descriptiva, a partir de porcentajes obtenidos de las frecuencias absolutas de presentación del parámetro y las frecuencias de presentación de cada etapa de Racine en los tratamientos evaluados. En cuanto las latencias comportamentales, electroencefalográficas, el área del soma, la forma y la densidad celular en células PV+ fueron evaluados por la ANOVA de Welch y la prueba de comparación múltiple de Games-Howell; el número de procesos primarios en células PV+ se evaluó a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la múltiple comparación de Dunn. Los análisis descritos previamente se llevaron a cabo en el software Prisma Graph Pad 8.0.1 (62).

Las potencias espectrales ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) de las frecuencias entre 1 y 15Hz, obtenidas a partir de la transformada rápida de Fourier, fueron analizadas inicialmente con gráficos descriptivos con los datos originales, y luego mediante el uso de bases B-splines, (63) se obtuvieron funciones (curvas) suavizadas para cada experimento bajo análisis, adicional a su curva media correspondiente a cada dosis de

tratamiento. A continuación, se realizaron pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianzas sobre los datos suavizados (64) para cada frecuencia, a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene (65), respectivamente. Con base en estos resultados, se determinó si era necesario usar el análisis de varianzas paramétricos (ANOVA), o si se podía acudir a pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) (66). Adicionalmente, se realizaron gráficos de dispersión entre la frecuencia Hz (en el eje x) y los valores-p (en el eje y) de las pruebas de comparación (ANOVA o Kruskal-Wallis), para identificar en cuáles frecuencias se detectaron diferencias significativas en los valores medios de las dosis de tratamiento. El procedimiento anterior también se llevó a cabo para determinar la existencia de diferencias significativas entre las curvas medias de los diferentes momentos evaluados.

Finalmente, en los casos necesarios, en cada frecuencia se aplicaron pruebas de comparación múltiple de Tukey (67) si se satisfacían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, o pruebas de comparación múltiple no paramétricas de Nemenyi (68), en caso contrario.

Estos análisis estadísticos se realizaron mediante el programa de distribución gratuita R versión 4.1.2 (69), determinando diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Preparación del extracto entero metanólico de *Annona muricata*

Después de la cocción a 100°C del extracto acuoso de 500 g de hojas de *A. muricata*, se obtuvo un sobrante de 1020 mL al cuál se le adicionó la misma cantidad de metanol. En total 2040 mL de extracto metanólico al 50% se dejaron reposar por 24 horas, y luego se filtró al vacío y se inició su rotaevaporación hasta obtener un volumen semiseco de 50 mL, que se distribuyeron en 50 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con un volumen de 1mL de extracto cada uno. Estos fueron secados en SpeedVac, obteniendo un peso aproximado 0,5 g por cada tubo. En total se obtuvieron 23,97 g de extracto seco.

4.2.2. Dosis letal 50 y dosis experimentales

Inicialmente se aplicó intraperitonealmente la dosis de 300 mg/Kg del extracto, diluida en el mismo vehículo a emplear en el estudio, encontrando que ninguno de los animales falleció tras 24h de la inyección, por lo que la evaluación de esta dosis se repitió siguiendo los parámetros de la OECD, encontrando el mismo resultado. Seguidamente se procedió a evaluar la dosis de 2000 mg/Kg del extracto, con la cual se obtuvo el mismo resultado, lo que se confirmó con una segunda evaluación. Finalmente se procedió a evaluar la dosis de 5000 mg/Kg del extracto, encontrando nuevamente que ninguno de los animales inyectados falleció en ninguna de las dos pruebas realizadas. Estos resultados son similares a los reportados por N'Gouemo et al. (1997) quien realizó pruebas de toxicidad con extracto entero etanólico de *A. muricata*, encontrando cero mortalidad tras 24 horas, en animales evaluados con dosis hasta de 1000mg/Kg (32). Debido a lo anterior y siguiendo los protocolos se estableció la dosis letal 50 como >5000 mg/Kg, y a partir de esta, se determinó usar para este estudio las dosis de 250, 500 y 1000 mg/Kg.

4.2.3. Video-electroencefalografía y estatus epiléptico con pilocarpina

Los resultados obtenidos a partir de la video-encefalografía mostraron que, en las ventanas de tiempo evaluadas para los análisis comportamentales, tras inyectar pilocarpina, sólo los animales tratados con vehículo presentaron la mayor parte del

tiempo los parámetros comportamentales de la clase 3 a 5 de la escala de Racine (60), es decir que los controles presentaron una manifestación de crisis con mayor intensidad que los distintos tratamientos; encontrándose un 14,28% de los animales inyectados con vehículo con crisis clase 2, un 42,86% con clase 3, un 28,57 con clase 4 y un 14,29% con clase 5 (Figura 6b). Resultados similares fueron reportados por Castro et al. (2011), donde el mayor porcentaje de animales inyectados con pilocarpina presentan crisis de clase 3 (70). Adicionalmente, en la mayoría de los animales inyectados con la solución vehículo se presentaron temblores finos (57,14%), fuertes (85.71%), salivación (100%) y piloerección (71.43%) y se dio ausencia de sedación (Figura 6a).

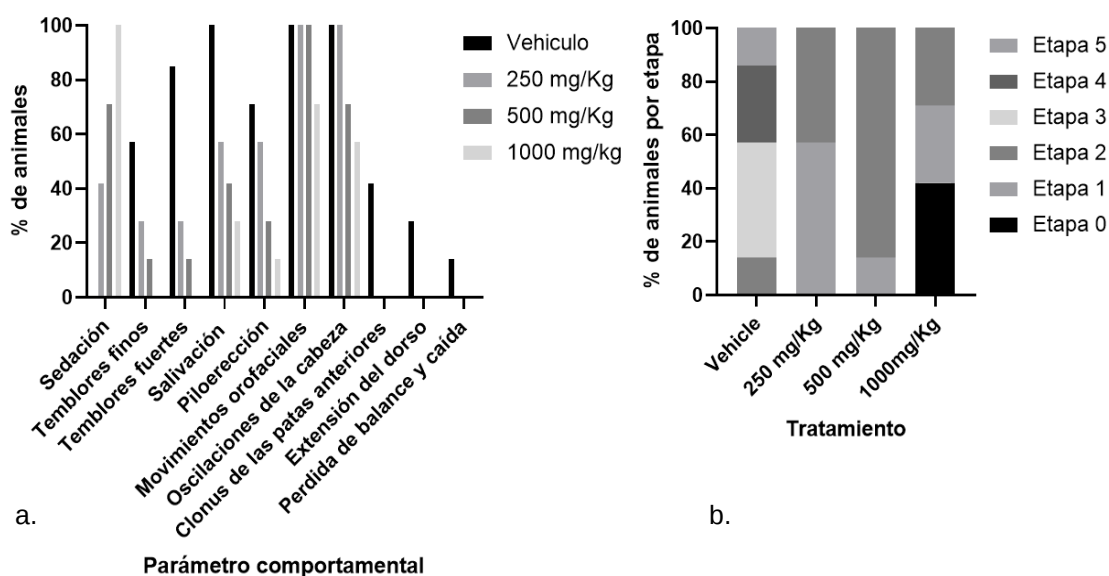


Figura 6. Parámetros comportamentales evaluados en video-EEG. a. Porcentaje de animales que presentan el parámetro evaluado (n=7 por tratamiento). b. Porcentaje de animales con mayor permanencia en cada etapa de Racine en 5 ventanas de 2 minutos en 30 minutos por tratamiento.

En cuanto a los tratamientos, en todos se presentó una tendencia de aumento de la sedación al incrementar la dosis evaluada, algo que se relaciona con la reducción del comportamiento exploratorio en animales tratados con dosis de 300 a 1000 mg/Kg de extracto entero etanólico de *A. muricata* por N'Gouemo et al (1997) (32). Los tratamientos de 250 y 500 mg/Kg presentaron temblores finos y fuertes en menos del 30% de los animales evaluados. Por su parte, en cuanto a los parámetros de salivación y piloerección se observa una disminución con los tratamientos desde un 57,14% a 28,57% en los animales tratados con 250 mg/Kg y a 14,29% en los animales tratados con 1000 mg/Kg. En cuanto a los parámetros relacionados con

las etapas de Racine, el 100% de los animales inyectados con las dosis de 250 y de 500 mg/Kg, presentaron movimientos orofaciales; siendo esta etapa la manifestada en la mayor parte del tiempo evaluado para la primera dosis mencionada (57.14%) (Figura 6).

Las oscilaciones de la cabeza se presentaron en la mayoría de los animales tanto inyectados con vehículo como con tratamientos (Vehículo y 250 mg/Kg = 100%, 500 mg/Kg = 71,43%, 1000 mg/Kg= 57,14%). Adicionalmente, esta etapa de Racine se presentó con mayor frecuencia en el tiempo en los animales inyectados con la dosis de 500 mg/Kg (85,71%). El tratamiento de 1000 mg/Kg fue donde menos se presentaron los parámetros comportamentales evaluados, de hecho, el 42,86% de los animales inyectados con este tratamiento no presentaron ninguna manifestación de la escala de Racine y se clasificaron en etapa 0, el resto de los animales se distribuyó entre la etapa 1 y 2 (28,57% en cada una) (Figura 6).

La latencia de las crisis se evaluó tanto comportamentalmente, como en las señales del EEG. Por una parte, se analizó el tiempo que tardan en presentarse las características comportamentales de cada etapa de Racine, en donde las etapas 3 a 5 como se mencionó previamente solo se presentaron en los animales inyectados con vehículo (media $\pm$ sd 128.71 $\pm$ 56.95 s en etapa 3, 169.71 $\pm$ 67.85 s en etapa 4 y 217.71 $\pm$ 114.15 s en etapa 5).

Por otro lado, las etapas 1 y 2 se presentaron en todos los animales evaluados, por lo que los tiempos se compararon entre los tratamientos y el vehículo, encontrando diferencias significativas en ambas etapas (Etapa 1 W=12.20, p=0.0012; Etapa 2 W=16.51, p=0.0003). Adicionalmente, al comparar cada tratamiento entre sí, se presentaron diferencias significativas entre la latencia de ambas etapas en los animales tratados con vehículo versus todos los tratamientos. Tanto en la presentación de la etapa 1 como en la etapa 2, la latencia de los animales tratados con vehículo fue menor (65.57 $\pm$ 55.16 y 77 $\pm$ 55.2 s, respectivamente) que los tratamientos (330.7 $\pm$ 202.5 y 343.6 $\pm$ 203.6 s para 250 mg/Kg; 224.3 $\pm$ 94.85 y 277.9 $\pm$ 84.17 s para 500 mg/Kg; y 295 $\pm$ 74.09 y 310 $\pm$ 61.6 s para 1000 mg/Kg respectivamente) (Tabla 3, 4 y Figura 7).

La latencia electroencefalográfica corresponde al tiempo que se tardó en presentarse la primera señal tipo crisis en el eeg de cada uno de los animales evaluados, encontrando resultados similares a los comportamentales, en los cuales la latencia de los animales fue diferente entre todos los tratamientos (W=6.176, p=0.0137), con una latencia en los animales inyectados con vehículo (59.07 $\pm$ 55.04

s) significativamente menor a la de los tratamientos (276.4 ± 232.6 s para 250 mg/Kg, 177.7 ± 110.7 s para 500 mg/Kg y 248.5 ± 92.28 s para 1000 mg/Kg) (tabla 5 y figura 8).

Tabla 3. Prueba de Games-Howell para comparación de latencia de Etapa 1 de escala de Racine

Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
Vehículo vs. 250 mg/Kg	3,342	6,885	0,0489
Vehículo vs. 500 mg/Kg	3,827	9,642	0,0157
Vehículo vs. 1000 mg/Kg	5,397	4,953	0,0113
250 mg/Kg vs. 500 mg/Kg	1,259	8,511	0,6094
250 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	0,4200	8,236	0,9735
500 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	1,372	7,821	0,5488

Tabla 4. Prueba de Games-Howell para comparación de latencia de Etapa 2 de escala de Racine

Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
Vehículo vs. 250 mg/Kg	3,344	6,878	0,0489
Vehículo vs. 500 mg/Kg	5,28	10,36	0,0015
Vehículo vs. 1000 mg/Kg	6,263	5,777	0,0036
250 mg/Kg vs. 500 mg/Kg	0,7893	7,993	0,8574
250 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	0,4051	7,682	0,976
500 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	0,7259	8,168	0,8841

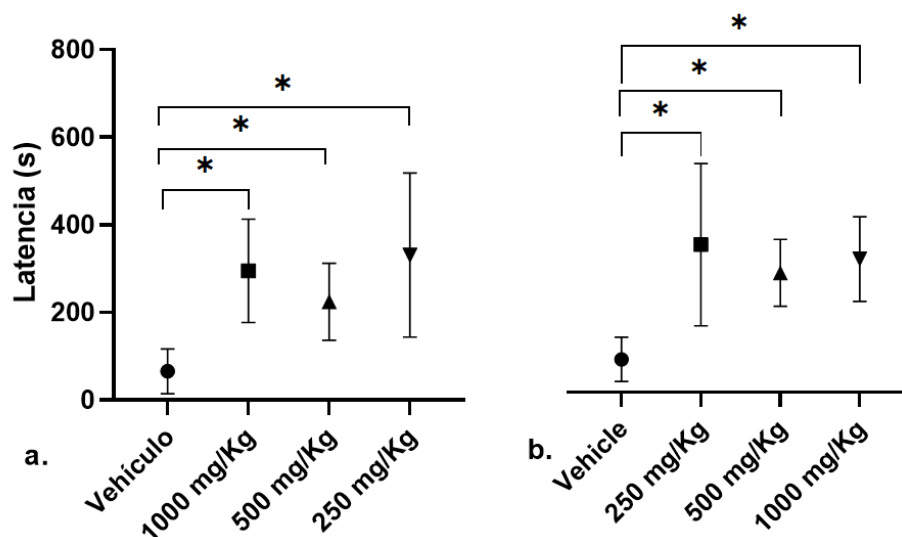


Figura 7. Latencia de etapas de Racine (a. Etapa 1 = Movimientos Orofaciales, b. Etapa 2= Oscilaciones de la cabeza). * corresponde a un $p < 0.05$.

Tabla 5. Prueba de Games-Howell para comparación de latencia electroencefalográfica

Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
Vehículo vs. 250 mg/Kg	2,406	6,670	0,0488
Vehículo vs. 500 mg/Kg	2,540	8,798	0,0323
Vehículo vs. 1000 mg/Kg	3,743	4,256	0,0180
250 mg/Kg vs. 500 mg/Kg	1,014	8,584	0,3383
250 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	0,281	8,475	0,7852
500 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	1,137	7,444	0,2910

Los resultados de un aumento en la latencia comportamental y electroencefalográfica con el uso de las tres dosis de tratamiento con extracto metanólico de *A. muricata* en crisis producidas por PILO, son similares a los reportes de latencia de crisis clónicas producidas por PTZ en animales inyectados con dosis de 5, 50, 100 y 300 mg/Kg de tratamiento con extracto entero etanólico de esta planta evaluado en ratones machos Swiss por N'Gouemo et al. 1997 (32).

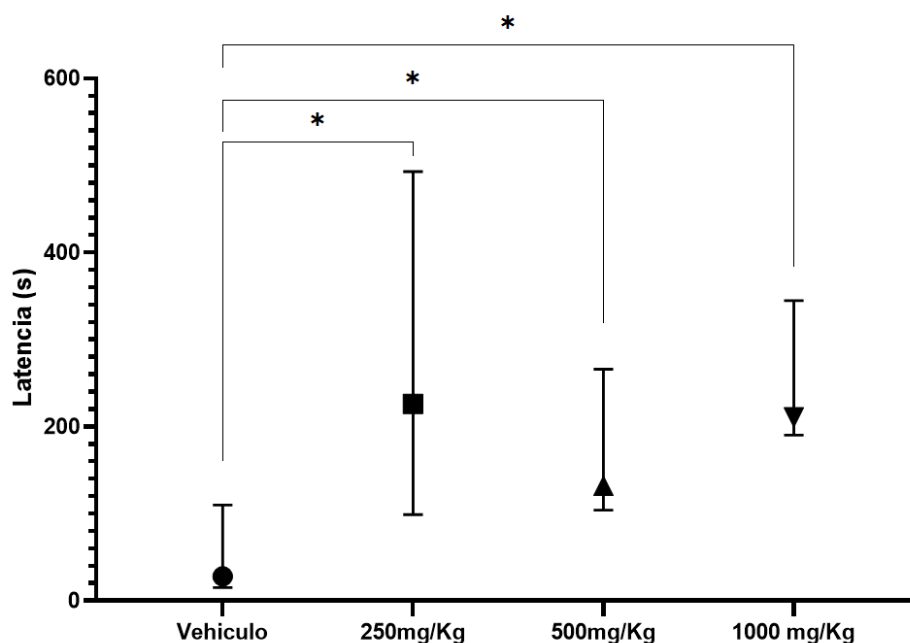


Figura 8. Latencia electroencefalográfica. * corresponde a un $p < 0.05$.

A partir de las señales de EEG se analizó una ventana de tiempo de 120 segundos para los tres momentos registrados (tiempo de control, tiempo con inyección de

tratamiento y tiempo con PILO). De los dos primeros momentos se tomó el tiempo posterior a los primeros 120 s y del momento 3 el tiempo posterior a la latencia. A los momentos mencionados se les aplicó la transformada continua wavelet Morlet (figura 9), y se analizó una ventana de frecuencias de 1 a 15Hz, debido a la importancia que estas frecuencias representan en la actividad hipocampal normal (ritmo theta 4-12 Hz) (30,71) y en la alterada en murinos susceptibles (ritmo delta 1-4Hz) (30,72). El espectrograma permite dilucidar una mayor magnitud de señal en las frecuencias bajas en todos los animales estudiados. Sin embargo, en la escala de 3 a 5,5 Hz se presenta una mayor magnitud en los animales tratados con vehículo en comparación con los tratados con extracto de *A. muricata*, en los que se presenta una disminución de este parámetro.

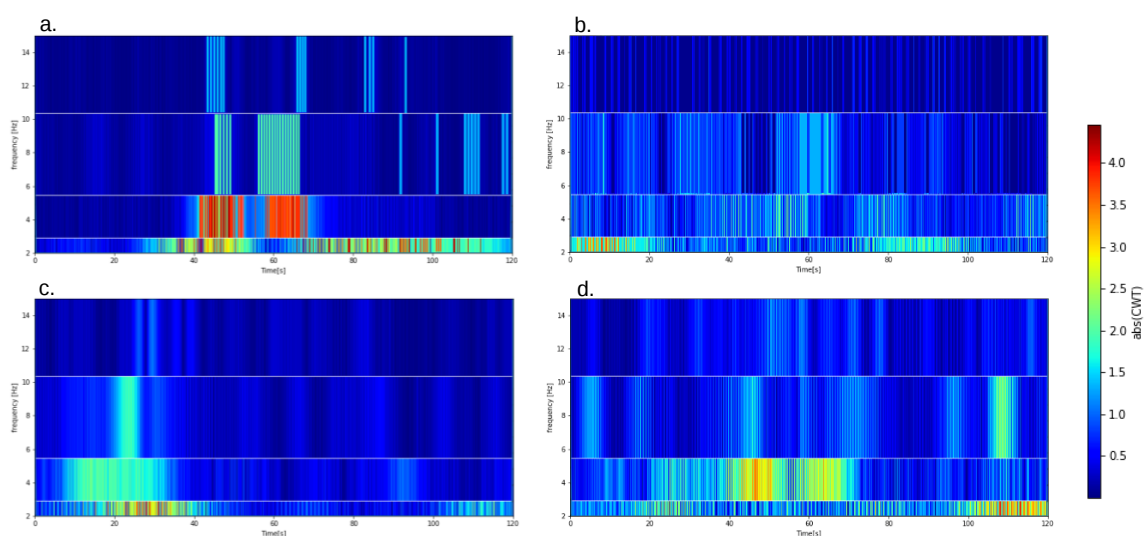


Figura 9. Espectrograma de la transformada continua wavelet Morlet en animales tratados con vehículo (a.), 250 (b.), 500 (c.) y 1000 mg/Kg (d.) de extracto entero metanólico de *A. muricata*.

Para conocer si estas diferencias espectrales son significativas, se aplicó la transformada de Fourier determinando las potencias espectrales ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$), encontrando los valores medios por tratamiento y por frecuencia que se presentan en la figura 10, donde se puede apreciar que en las frecuencias bajas se encuentran las potencias más altas, las cuales son más elevadas para las dosis 250, 500 y 1000 mg/Kg con respecto al control (que para estos análisis corresponde a los animales inyectados con vehículo), particularmente en los momentos 1 y 2. También se puede apreciar que el tratamiento control aumenta sus potencias a través de los momentos principalmente en las frecuencias más bajas, similar a las alteraciones del ritmo

delta presentadas en modelo de ratón *EI* ante la prueba de suspensión de la cola (30,72) y esperadas por el no uso de tratamiento en este caso; mientras que el tratamiento 250 mg presenta un comportamiento inverso.

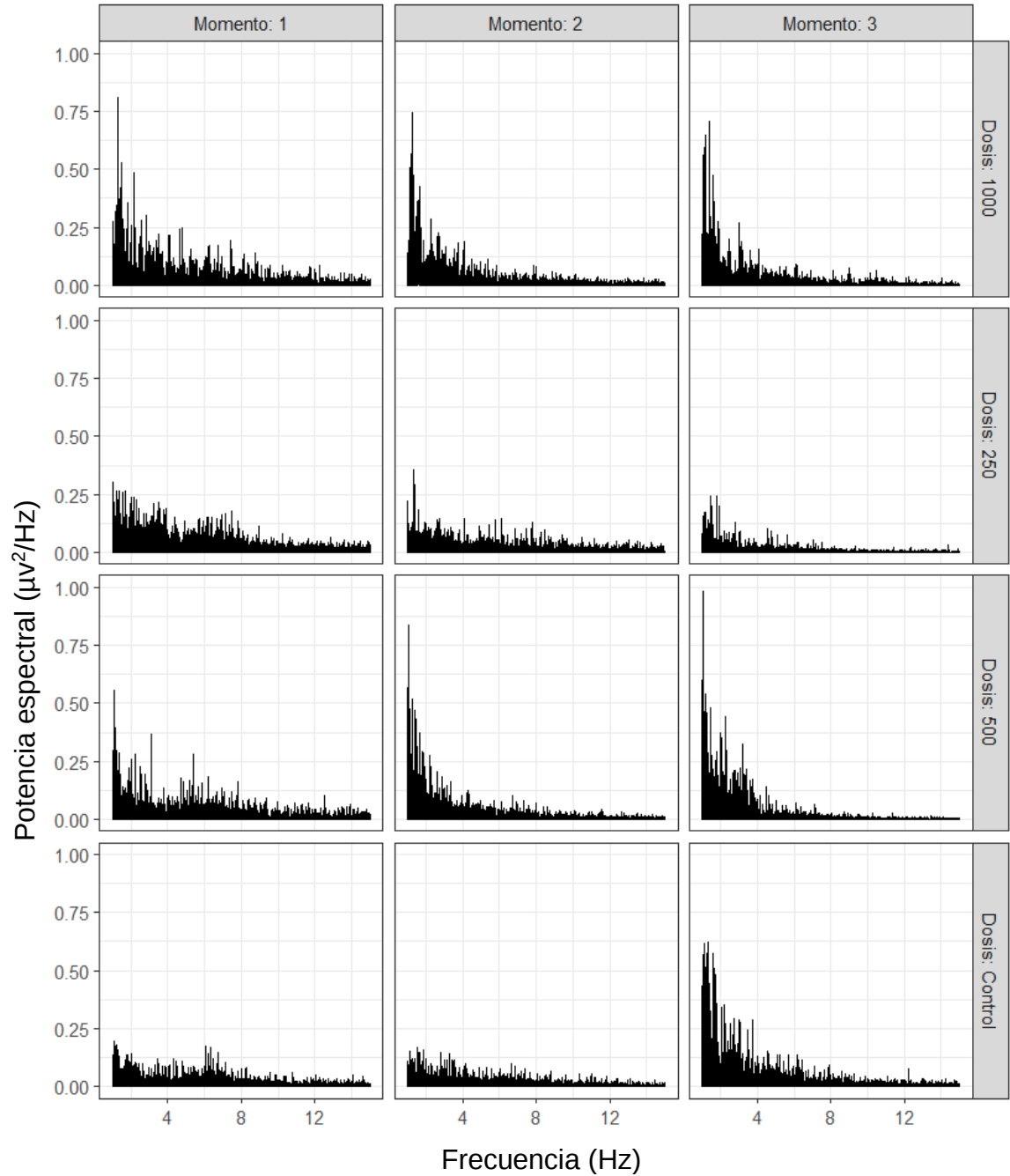


Figura 10. Potencias medias espectrales ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) obtenidas a partir de la transformada de Fourier en cada frecuencia según Dosis de tratamiento y Momento

Debido a la alta varianza de los datos y la dificultad que esto genera para su análisis, las potencias espectrales fueron suavizadas mediante el uso de B-splines, obteniendo las curvas medias presentadas en la figura 11. Los momentos 1 y 2 del tratamiento control presenta una curva media inferior a las obtenidas con las dosis 250, 500 y 1000 mg, mientras que para el momento 3 las curvas tienden a homogenizarse con una aparente disminución de la curva de potencia media para la dosis de 250mg en las frecuencias bajas asociadas al intervalo [1-4 Hz], lo que puede significar una disminución de la alteración del ritmo delta esperado en comportamientos electroencefalográficos anormales (30,72), y por ende una posible acción de disminución de la crisis. Una tendencia evidente en todas las curvas medias de cada dosis y momento es la disminución de las potencias en la medida que la frecuencia aumenta, sin mostrarse que las potencias de algún tratamiento predominen sobre los otros a lo largo de todo el rango de frecuencias, esto se encuentra relacionado con las frecuencias relevantes intrahipocampales que incluyen principalmente los ritmos delta y theta.

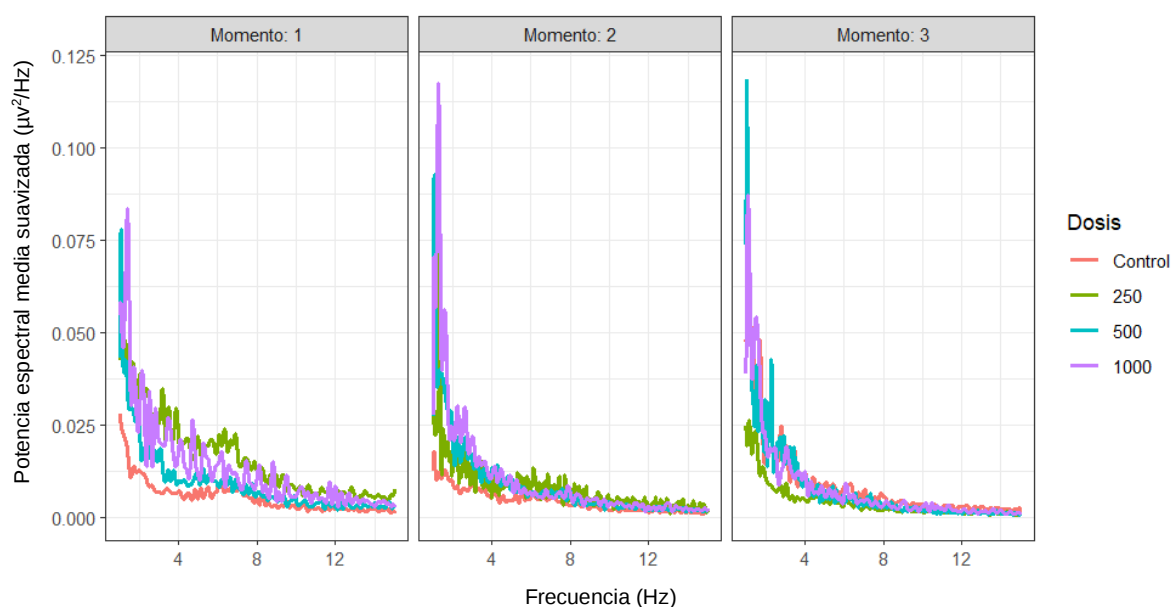


Figura 11. Potencias espectrales medias suavizadas ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) según Dosis de tratamiento y Momento.

Para establecer estadísticamente si existen o no diferencias significativas entre las medias de las dosis por cada momento de análisis, usualmente se aplica la técnica denominada ANOVA, la cual se fundamenta en supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Esto supone que, para cada frecuencia, los datos de

potencia suavizados se ajustan a una distribución de probabilidad normal y que las varianzas de las cuatro dosis de tratamiento no difieren significativamente.

En las figuras 12 y 13 se presentan respectivamente los valores-p de las pruebas de hipótesis de normalidad (test de Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (test de Levene) efectuadas en cada frecuencia con los datos de potencia suavizados de las dosis de tratamiento, para cada momento.

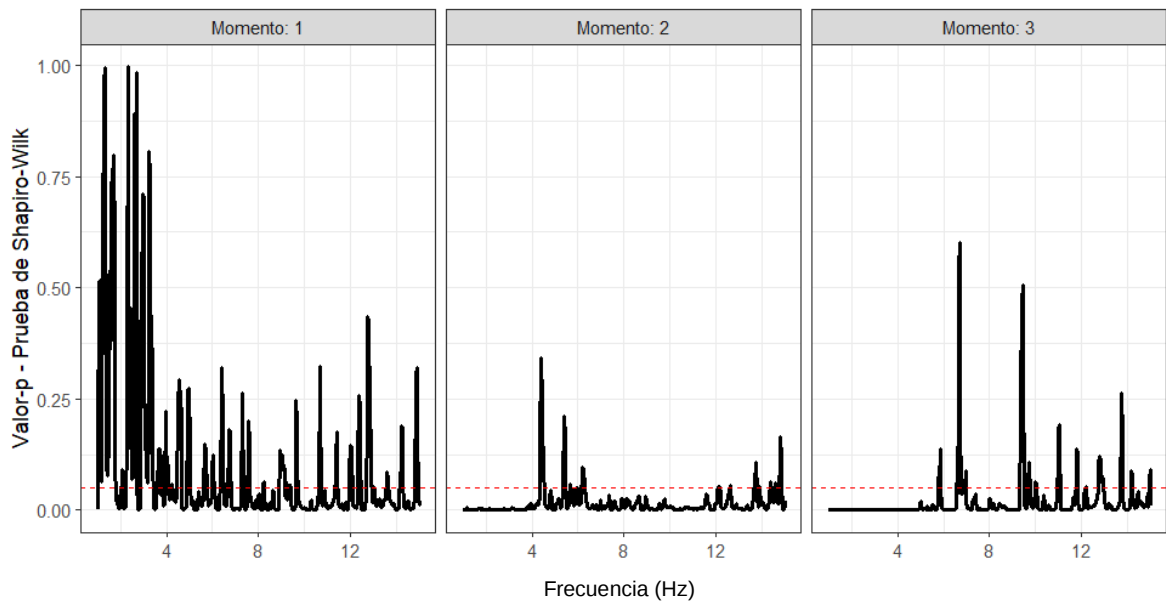


Figura 12. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de normalidad. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

En la mayoría de las frecuencias, los valores-p de las pruebas de hipótesis indican que estos supuestos requeridos para el uso del ANOVA no se satisfacen, particularmente el supuesto de normalidad que presenta en general valores-p por debajo del nivel de significancia del 5% (línea punteada en la figura 12), lo que lleva al rechazo de la hipótesis de normalidad.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se decidió emplear la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las dosis de tratamiento en cada frecuencia. Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis se muestran en la figura 14, donde se puede establecer que para cada momento de análisis las potencias suavizadas no difieren significativamente entre las dosis de tratamiento a lo largo de todas las frecuencias evaluadas para los momentos 2 y 3 (valores-p por arriba del nivel de significancia del 5% correspondiente a la línea punteada en la figura 14). Sin embargo, para el momento 1 se pueden apreciar diferencias entre las dosis

en los intervalos de frecuencias [1.475 – 1.658], [2.333 – 2.350], [3.175 – 3,225], [4.283 – 4.375] y [12.792 – 12.850]. Siendo menor la actividad delta en los animales del control respecto a los de los tratamientos en estas frecuencias. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el momento 1 se refiere a un momento de control el cual sirve de base para comparar los momentos de tratamiento e inyección de pilocarpina con la actividad basal del animal, por lo que se procedió a analizar la actividad de los animales entre los momentos dentro de cada dosis.

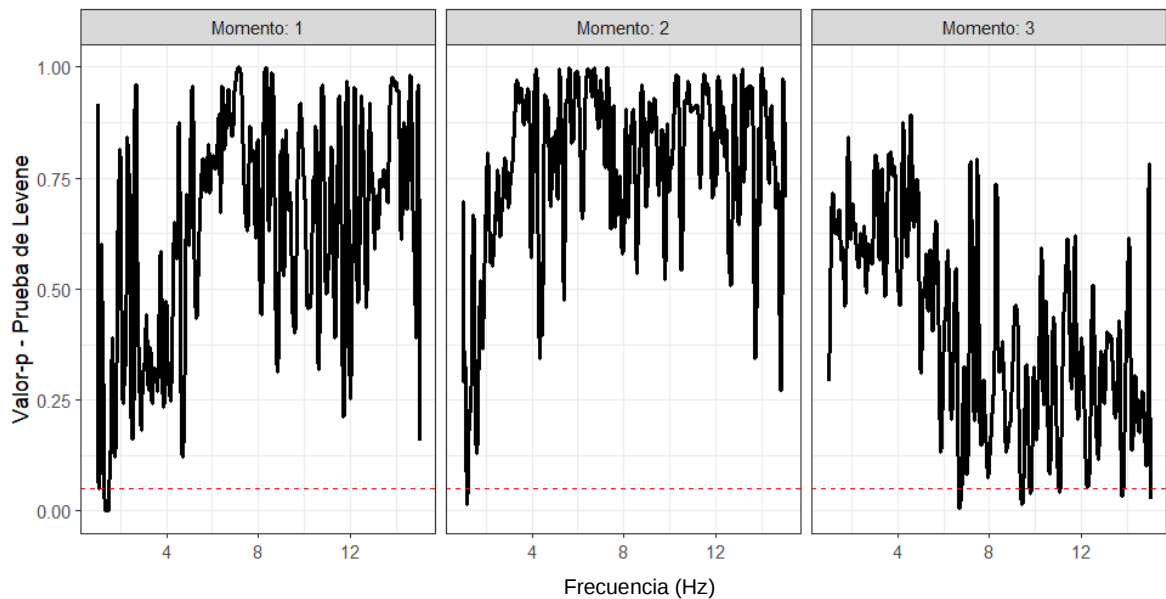


Figura 13. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de homogeneidad de varianzas. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

Los resultados de las curvas medias por momento según cada dosis de tratamiento (figura 15), descriptivamente muestran que el momento 1 tiene una curva media de potencia superior a las obtenidas en los demás momentos para los tratamientos 250 y 1000 mg; mientras que para el control las potencias más elevadas se encuentran en el momento 3, particularmente en frecuencias bajas, alteración ya antes mencionada y relacionada con el aumento de la actividad delta durante crisis reportada previamente (30,72).

En las figuras 16 y 17 se presentan los valores-p de las pruebas de hipótesis de normalidad (test de Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (test de Levene) efectuadas en cada frecuencia con los datos de potencia suavizados de los distintos momentos, para cada dosis de tratamiento. En el tratamiento control se evidencia

que el valor-p de la prueba de Shapiro-Wilk es inferior al nivel de significancia del 5% (ver figura 16) para todo el rango de frecuencias evaluado, sugiriendo el rechazo de la hipótesis de normalidad. Para las dosis 250, 500 y 1000mg se evidencia una fluctuación sin una clara tendencia de los valores-p alrededor del nivel de significancia, sugiriendo que la prueba de normalidad no se rechaza en algunas frecuencias bajas, intermedias y altas. Por otro lado, la prueba de Levene (ver figura 17) sugiere que existe homogeneidad de varianzas en todo el rango de frecuencias para los tratamientos control, dosis 500 y 1000 mg, mientras que en el tratamiento con dosis a 250 mg se evidencia un rechazo de la hipótesis de homogeneidad de varianzas en frecuencias intermedias y altas (valores-p por debajo del nivel de significancia del 5%).

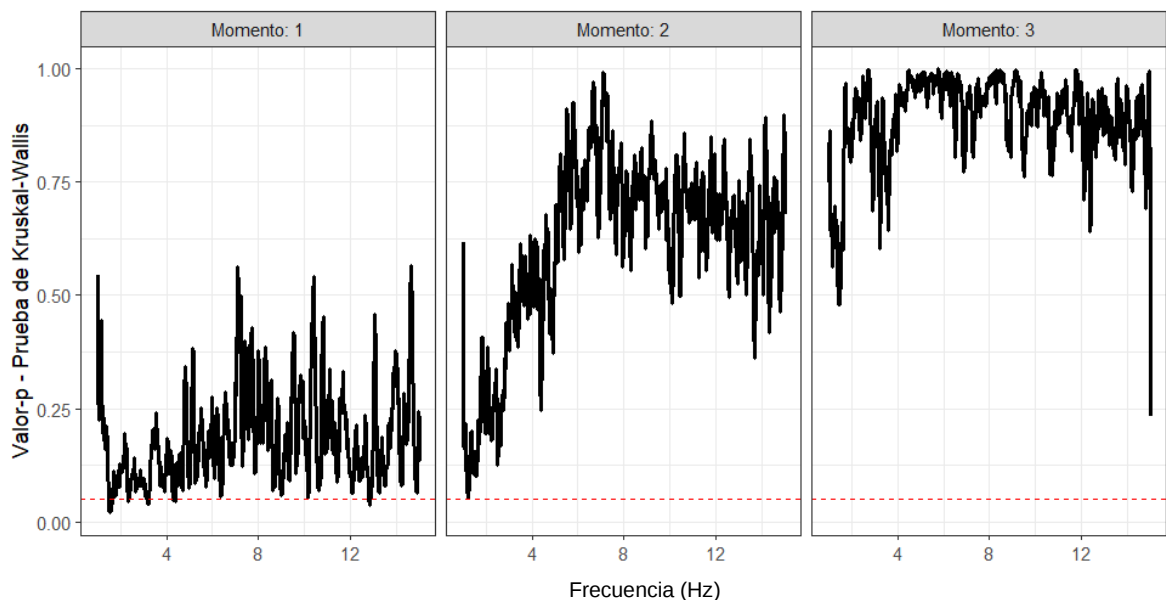


Figura 14. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de Kruskal-Wallis. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se decidió emplear la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los momentos en cada frecuencia. Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis se muestran en la figura 18, donde se puede establecer que para el control y las dosis de 500 y 1000 mg las potencias suavizadas no difieren significativamente entre los momentos evaluados a lo largo de todo el espectro de frecuencias (valores-p por arriba del nivel de significancia del 5% correspondiente a la línea punteada en la figura 18). Sin embargo, para la dosis 250 mg se muestra un comportamiento diferente, donde se encuentran diferencias significativas entre por lo menos dos de los tres momentos analizados.

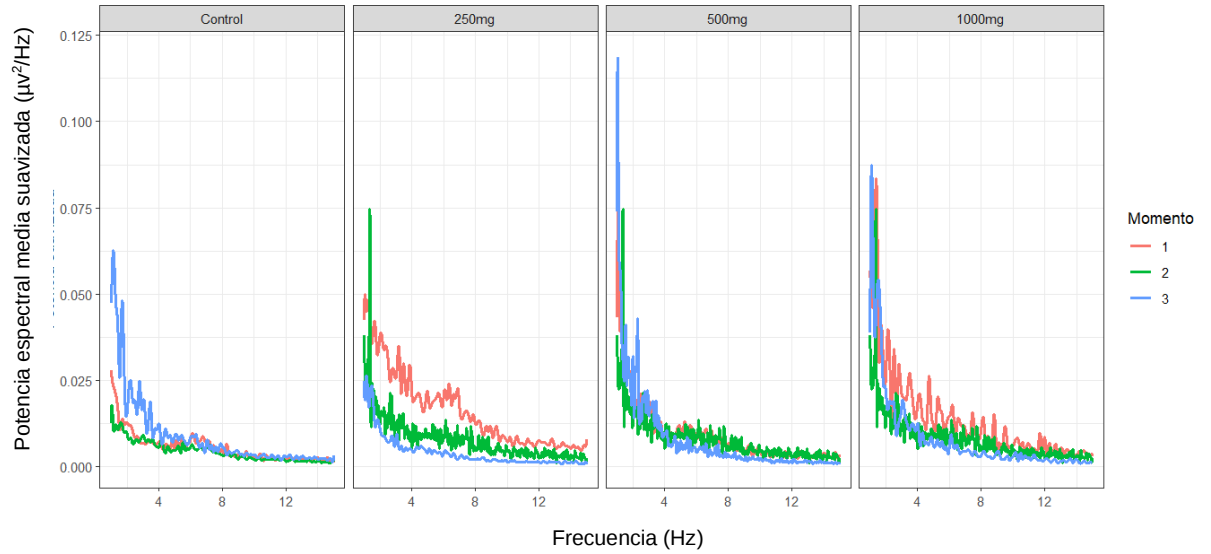


Figura 15. Potencias espectrales medias suavizadas ($\mu v^2/Hz$) según Momento y Dosis de tratamiento.

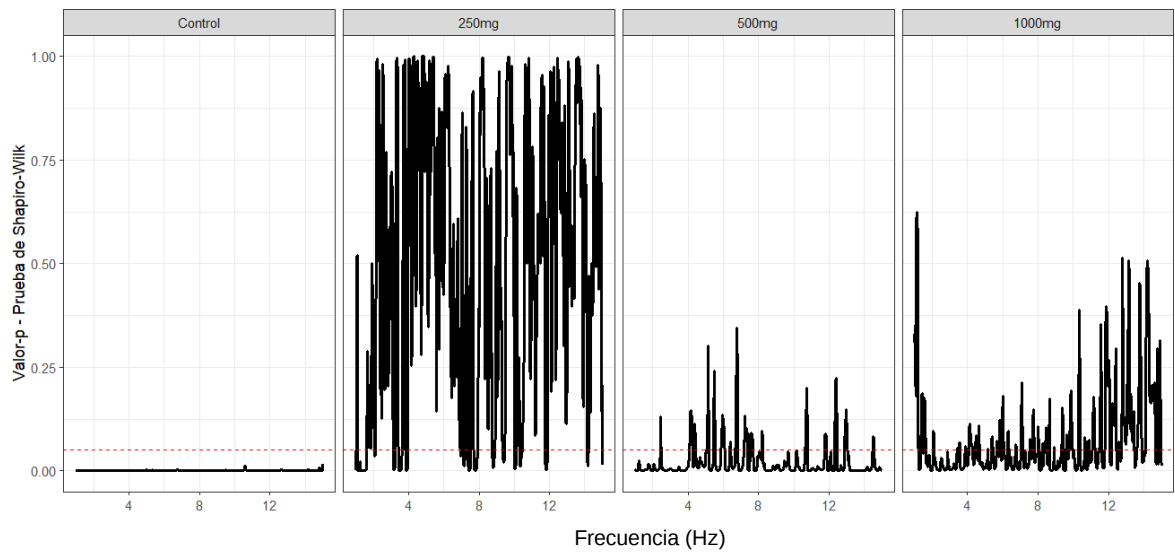


Figura 16. Comparación entre Momentos: Valores-p de las pruebas de hipótesis de normalidad. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

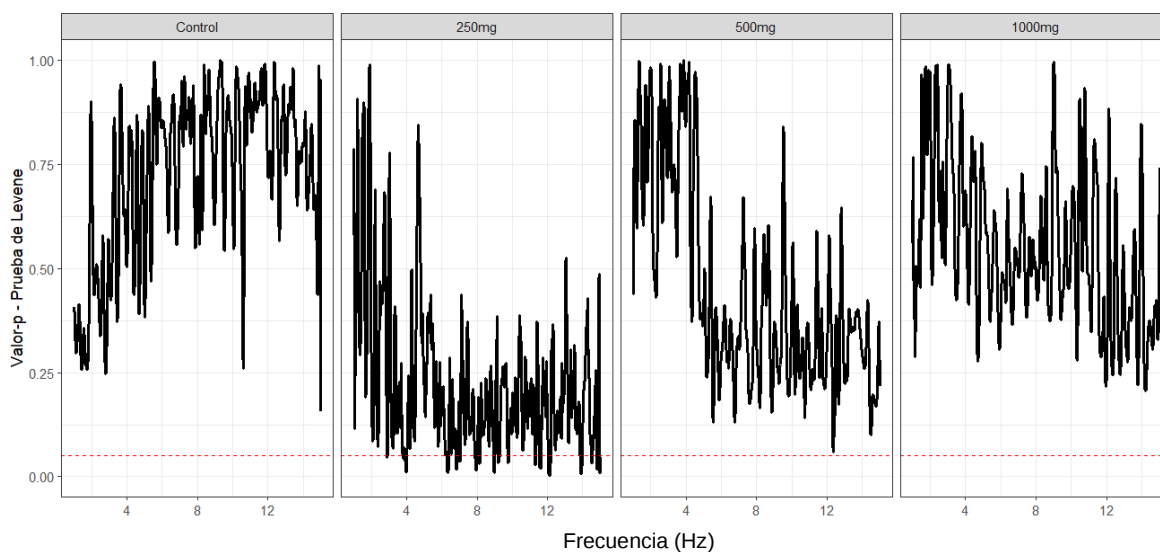


Figura 17. Comparación entre Momentos: Valores-p de las pruebas de hipótesis de homogeneidad de varianzas. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

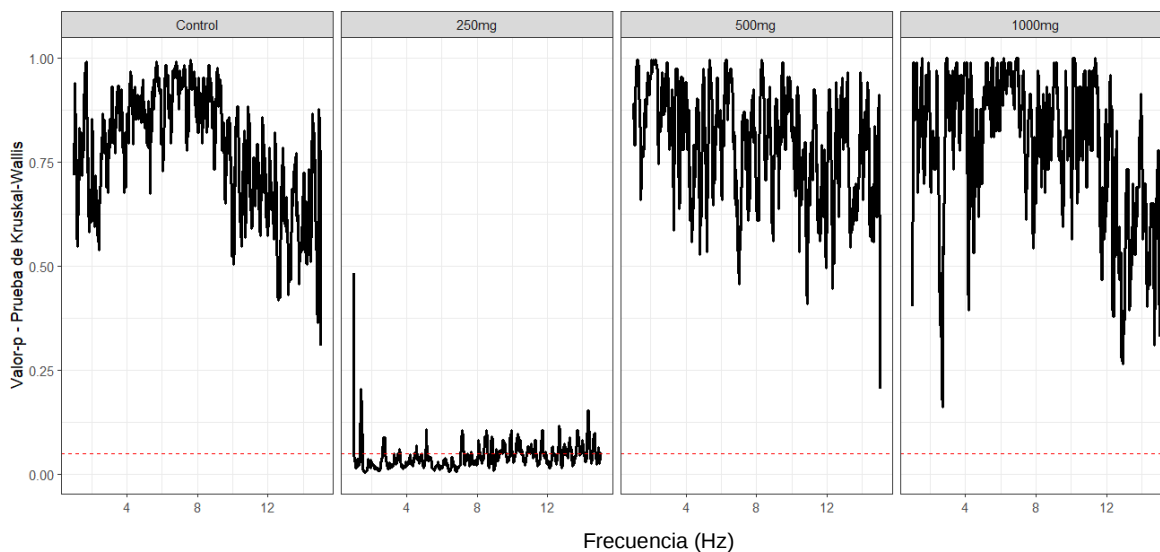


Figura 18. Comparación entre Dosis: Valores-p de las pruebas de hipótesis de Kruskal-Wallis. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

En la figura 19 se muestran los resultados de la prueba de comparación múltiple de Nemenyi para el tratamiento de 250 mg/Kg, donde se evidencia que en relación con las potencias existen diferencias significativas para los momentos 1 y 2 en los

intervalos de frecuencias bajas [1.1167 – 1.1667], [1.525 – 1.6583] y [1.9 – 1.9583]. Entre los momentos 1 y 3 se encuentran diferencias a lo largo de prácticamente todo el espectro de frecuencias, mientras que entre los momentos 2 y 3 no se muestran diferencias significativas entre las potencias suavizadas, lo cual se puede observar en la figura 15, donde se evidencia una disminución de la potencia espectral después de la inyección del extracto entero metanólico de *A. muricata* (momentos 2 y 3) respecto al momento de control (momento 1). La disminución de potencia a través de los tres momentos evaluados a esta dosis está relacionada con la disminución de las crisis tónico-clónicas producidas por PTZ a dosis de 100 y 300mg/Kg. Adicionalmente, el efecto contrario de no controlar las convulsiones a dosis de 500 y 1000 mg/Kg puede estar relacionado con la toxicidad aguda reportada a dosis altas, donde se ha producido una reducción del comportamiento exploratorio y constricciones abdominales en el 60% de los ratones evaluados (32), ya que si bien a altas dosis puede haber mayor concentración de compuestos anticrisis, también la hay de compuestos que puedan ser dañinos para el organismo.

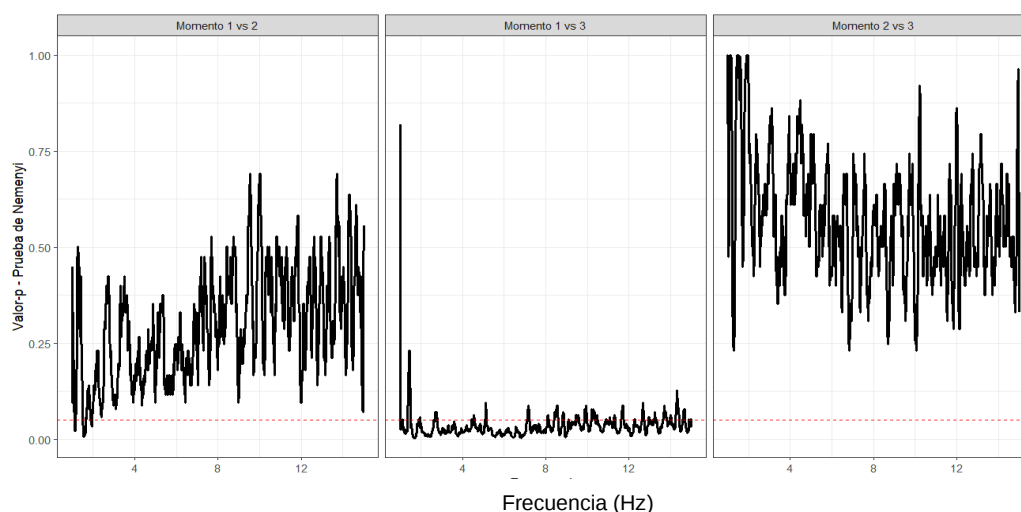


Figura 19. Comparación múltiple de Nemenyi entre los momentos evaluados para la dosis de tratamiento 250 mg. La línea punteada de color rojo corresponde al nivel de significancia de la prueba del 5%.

4.2.4. Evaluación de neuroprotección

El análisis morfológico utilizado para revisar el efecto neuroprotector del extracto entero metanólico de *A. muricata* sobre las células PV+ se muestra en la figura 20, su estadística descriptiva e inferencial se presenta de manera ampliada en el anexo 2. Se analizaron los parámetros área del cuerpo celular, forma celular, densidad celular y número de procesos principales en la corteza, CA1, CA3 e hilio. El análisis de este grupo celular es altamente importante debido que corresponden a células

gabaérgicas relevantes en el proceso de inhibición y por tanto en el control de crisis epilépticas.

El análisis del número de procesos primarios permitió establecer diferencias significativas en la corteza ($K-W=13.31$, $p=0.0099$) y CA1 ($K-W=22.09$, $p=0.0002$), donde el tratamiento con 1000 mg/Kg presenta una disminución en el número de procesos en estas áreas, significativamente diferente a los controles sin ningún tratamiento (Corteza: $p=0.0193$, CA1: $p=0.0007$), y en el caso de CA1 también respecto al tratamiento de 500 mg/Kg ($p=0.004$), estos resultados indicarían una menor conectividad de las neuronas PV+, lo que hace que la acción gabaérgica (inhibitoria) en las células tratadas con 1000 mg/Kg se vea disminuida, lo cual está relacionado con la no disminución de las potencias espectrales en las frecuencias bajas esperada para la acción del tratamiento, y que se explica por los reportes de toxicidad hechos para esta dosis en ratón Swiss tratado con extracto entero etanólico de la planta (32).

En el parámetro morfológico área del soma de las células PV+ se encontró una tendencia a ser mayor en corteza, CA1 y CA3 en los animales tratados con vehículo respecto al control, sin embargo, esta tendencia no tiene diferencias significativas. De otro lado, en corteza los animales tratados con las dosis de 250 mg/Kg presentan un área de soma significativamente menor respecto a los tratados con 1000 mg/Kg, vehículo y control (Figura 20, anexo 2).

La forma celular mide el grado de circularidad de la célula siendo 0 nada circular y 1 totalmente circular. Este parámetro fue el que más diferencias significativas presentó entre los tratamientos. Los animales tratados con vehículo y 1000 mg/Kg tendieron a presentar una forma menos circular respecto a los controles en todas las áreas evaluadas, a diferencia de los animales tratados con 500 mg/Kg que fueron similares a los controles. Las principales diferencias en este parámetro se dieron entre el grupo tratado con 250mg/Kg y todos los demás grupos debido a que el soma de estas neuronas es más circular (Figura 20, anexo 2).

La densidad celular es similar entre tratamientos en corteza, CA1 e Hilus excepto por diferencias entre el grupo tratado con 250 mg/Kg y 500 mg/Kg en corteza; 500 mg/Kg y vehículo en CA1; y 250 mg/Kg y 1000 mg/Kg y vehículo en Hilus. En CA3 los controles tienen una densidad celular significativamente mayor que los animales tratados con vehículo, 250 y 500 mg/Kg, este último resultado se relaciona con lo reportado por Krsek et al. (2004), quienes encontraron una disminución del número de células que expresan PV después del sometimiento a pilocarpina, sin embargo este estudio fue realizado después de dos meses y no en fase aguda como el aquí presentado (73).

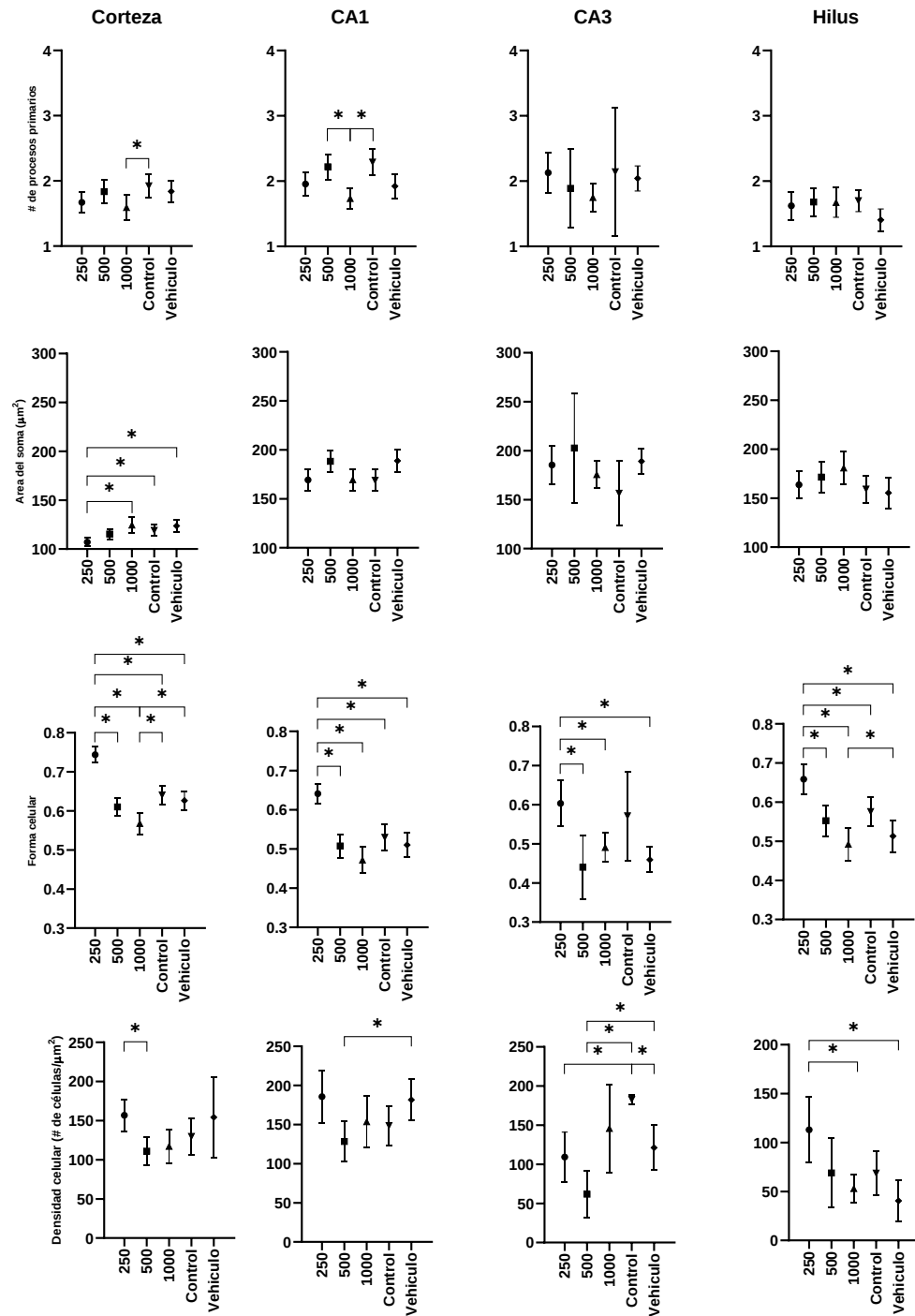


Figura 20. Análisis morfológico a través de los parámetros # de procesos primarios, Área del soma, Forma del soma y Densidad celular de células PV+ en corteza, CA1, CA3 e Hilus en controles y animales tratados con vehículo, 250, 500 y 1000 mg/Kg de extracto entero metanólico de *A. muricata*.

El tratamiento de 500 mg/Kg muestra una tendencia de menor densidad celular respecto al control tanto en corteza como en CA1 y CA3, por su parte el de 1000 mg/Kg tiene una tendencia similar, pero en corteza y CA4 (Figura 20) lo que se relaciona con la no diferenciación de las potencias entre los momentos 1, 2 y 3, permitiendo la presentación de crisis (documentadas por EEG) similares a las presentadas por los animales tratados con vehículo (Figura 15).

Por el contrario, el tratamiento de 250 mg/Kg se diferencia, ya que las células que expresan parvalbúmina en este tratamiento presentan un área de soma celular más pequeño, una forma celular más circular y una mayor densidad celular, y aunque se ha reportado una mayor densidad de células que expresan PV como parte de un proceso de neurogénesis ante el daño con PILO como búsqueda de protección inhibitoria ante las crisis, esto se ha encontrado en animales con hasta 10 días de vida, por lo que no puede ser comparado con los resultados aquí presentados, ya que en este trabajo se emplearon animales adultos jóvenes (74,75).

Debido a lo anterior es importante tener en cuenta que el aumento de expresión de PV, no necesariamente se debe un proceso de neurogénesis, sino a la plasticidad cerebral que permite que células que normalmente no expresan parvalbúmina comiencen a hacerlo como medida de protección, esto ya se ha observado en animales a los cuales se les ha puesto dosis de pilocarpina bajas que no producen estatus epiléptico comportamental (etapa 5 de la escala de Racine), algo relacionado con lo encontrado en los animales de este estudio donde con los tratamientos no se observaron etapas 3, 4 y 5 de Racine (73).

El análisis comportamental, electroencefalográfico y neuroprotector permite establecer una posible acción anticrisis del extracto entero de *A. muricata*, sin embargo, uno de los inconvenientes presentados en las respuestas obtenidas es la alta variabilidad de los datos, que llevo a análisis estadísticos que permitan emplear muestras con diferencias de varianzas y/o normalidad, una de las razones por las cuáles esto puede presentarse es debido a la variabilidad en la respuesta que se puede dar ante el tratamiento con quimoconvulsivantes como en el caso de PILO que según Bankstahl et al. (2012), puede producir animales con resistencia farmacológica, generando respuestas diferenciadas a los tratamientos que se empleen (76), y de esta manera otorgando una mayor relevancia a la dosis de 250 mg/Kg debido a que manifiesta cambios en los animales en los que se emplea aún con la variabilidad encontrada.

4.3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo respaldan la hipótesis de un efecto anticrisis comportamental del extracto entero de *A. muricata*, debido a la no presencia de crisis de etapas 3, 4 y 5 de Racine en los animales tratados. Sin embargo, la evaluación electroencefalográfica e inmunohistoquímica muestran una acción anticrisis de la dosis de 250 mg/Kg más no de las otras dos dosis evaluadas. Esto teniendo en cuenta que la dosis inicialmente mencionada produce un aumento en la densidad celular, la forma y área del soma de células PV+ diferenciada del resto de tratamientos y controles, lo cual lleva a pensar en una posible expresión de PV en grupos celulares que antes no lo hacían y que permiten un mayor efecto inhibitorio que puede explicar la disminución de la actividad electroencefalográfica evidenciada por la disminución en las potencias espectrales en las frecuencias de 1 a 15 Hz en los momentos de evaluación de inyección de tratamiento y pilocarpina.

La falta de acción anticrisis de las dosis mayores a 250mg/Kg puede ser explicada por los reportes de toxicidad que se han presentado en dosis superiores a 300 mg/Kg, debido a una posible concentración aumentada de compuestos que puedan ser dañinos para el organismo, por lo que es necesario conocer la composición química del extracto entero metanólico de *A. muricata* evaluado en este estudio.

5. CAPÍTULO 2.

Análisis del acoplamiento molecular de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico completo de las hojas de *Annona muricata* en el sitio de unión extracelular de benzodiazepinas del receptor GABA-A.

5.1. METODOLOGÍA

5.1.1. Caracterización GC del extracto entero metanólico de *Annona muricata*

Para caracterizar la complejidad del extracto entero metanólico de las hojas de *A. muricata* se tomaron 5 mg del extracto en polvo, el cual se resuspendió en 100 μ L del metanol absoluto, lo que logró una suspensión a una concentración final de 50 mg/mL. Acto seguido la mezcla fue filtrada empleando jeringa con filtro de 0,2 μ m.

Con el propósito de observar la complejidad y diversidad de moléculas en la muestra, se tomó 1 μ L de la muestra filtrada y esta fue inyectada en el cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS. Para obtener los espectros mediante el GC-MS.

El equipo GC-MS usado para este análisis comprendía un Detector Selectivo Agilent 7890A GC conectado a Agilent 5975C MSD. Las muestras fueron procesadas bajo las siguientes condiciones: presión 101.89 kPa, flujo de 34.279 ml/min, volumen inyectado 1 μ L, programa de temperatura: 1 min a 100 °C, seguido 10 °C/min hasta 250 °C por 2 min, y 15 °C/min hasta 295 °C por 5 min. El tiempo de corrida fue de 26 min. Se compararon los tiempos de retención para cada pico obtenido y las similitudes de los espectros de masas para cada pico comparando estos con la biblioteca de bases de datos NIST14.L y W808.L. Los compuestos identificados, fueron consultados en las bases de datos de literatura biomédica, caracterizando su posible acción, especies donde se han reportado, y observaciones adicionales.

5.1.2. Análisis *in silico* del extracto entero metanólico de las hojas de *Annona muricata*

Para conocer posible efecto farmacológico de los compuestos identificados y su posible acción anticrisis, se llevaron a cabo pruebas *in silico* que incluyen el análisis de biodisponibilidad de las moléculas encontradas, el acoplamiento molecular y a

partir de los dos anteriores la dinámica molecular del compuesto con mejores características energéticas y de biodisponibilidad, comparado con los fármacos Diazepam y Flumazenil.

5.1.2.1. Análisis de biodisponibilidad *in silico*: propiedades físicoquímicas y farmacológicas.

Las estructuras de los compuestos presentes en el extracto entero metanólico de *A. muricata* utilizados en este estudio se cargaron en el servidor web SWISSADME (<http://www.swissadme.ch/>), que es una base de datos de modo simulado de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un compuesto y otras propiedades físicoquímicas y farmacocinéticas que se correlacionan con la predicción de biodisponibilidad.

5.1.2.2. Acoplamiento molecular

Se desarrollo un acoplamiento entre proteína-ligando (proteína-fármaco) en el cual se empleó como blanco farmacológico el sitio de alta afinidad de las benzodicepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A, debido a su relación con la acción anticrisis de fármacos como el diazepam. Para ello, se empleó la estructura del receptor GABA_A $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, obtenida en el Protein Data Bank, con PDB código ID 6X3X.

La estructura 3D del PDB de la proteína se encuentra co-cristalizada con los ligandos NAG (2-acetamino-2-deoxi-beta-D-glucopiranososa), BMA (beta-D-manopiranososa), MAN (alfa-D-manopiranososa), DZP (Diazepam), ABU (GABA). Para el desarrollo del acoplamiento la estructura proteica fue optimizada removiendo sus ligandos no proteicos con el programa UCSF Chimera (77) y sus moléculas de agua, además de adherir hidrógenos polares, aplicar cargas de Kollman y transformar el archivo de formato PDB a PDBQT en el programa AutoDock Tools (78).

Las estructuras de los compuestos identificados por GC-MS, junto a las de los fármacos diazepam y flumazenil (como agonista y antagonista respectivamente del sitio escogido para el acoplamiento), fueron obtenidas en 3D de Pubchem en formato .sdf. Estas fueron optimizadas con ab-initio por el método DFT a través el multiparámetro funcional B3LYP y el conjunto de bases gaussianas 6-31G, utilizando el programa Gaussian 09 (79). Los resultados fueron optimizados

geométricamente y convertidos al formato “.mol2”. Posteriormente: los hidrógenos polares, las cargas de Gasteiger y la rotación de enlaces libres se incorporaron a las moléculas en un archivo de formato “.pdbqt” utilizando Open Babel 2.4.1(80).

Los ligandos y el receptor GABA_A en formato .pdbqt fueron empleados para el desarrollo de acoplamiento molecular con AutoDock Vina (81), a través de un protocolo de cadena flexible y un algoritmo optimizador global de búsqueda local iterado. Este acoplamiento flexible de los compuestos con GABA_A se realizó automáticamente, a través de un script bash, ejecutándose en una estación de trabajo Precision 7920 utilizando Linux Ubuntu 18.04. El sitio de acoplamiento se seleccionó según la ubicación del diazepam co-cristalizado en la unión de ECD (α 1D) que se encuentra en el código de archivo PDB ID 6X3X, para esto se utilizó una cuadrícula o espacio definido lo suficientemente grande como para permitir que el ligando acoplado gire libremente de x 25, y 25 y z 25 Å y las coordenadas XYZ elegidas para ser el centro fueron 89.473, 125.992 y 105.598 (Figura 21), respectivamente. El acoplamiento se realizó con un número de modos de enlace igual a 10 y una exhaustividad de 1000. Se almacenó la posición con mayor afinidad negativa (Kcal/mol).

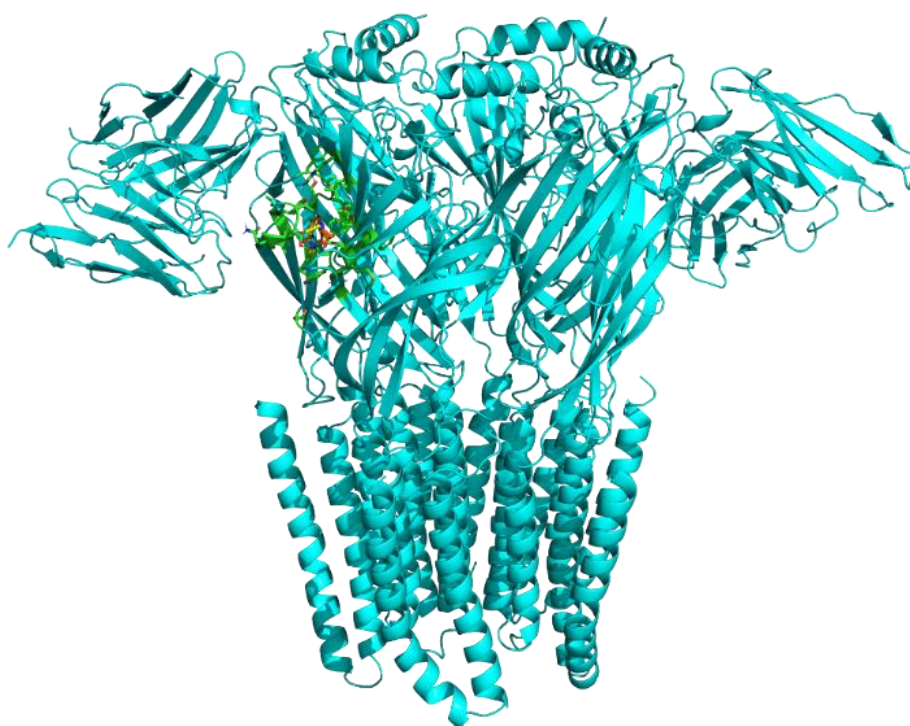


Figura 21. Receptor GABA_A. Los aminoácidos representados en verde forman el sitio de acoplamiento (ECD del sitio de benzodiazepinas de alta afinidad). En naranja se representan los ligandos.

Los complejos GABA_A-Ligando generados por acoplamiento molecular se analizaron utilizando el software LigPlot+ v.2.2.5 (EMBL-EBI, The European Bioinformatics Institute) y confirmados por el servicio web The Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Biotechnology Center TU Dresden), que generan diagramas esquemáticos 2D de interacciones proteína-ligando a partir de coordenadas 3D. Estos diagramas representan los patrones de interacción de enlaces de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos entre los ligandos y los elementos de la cadena principal o de la cadena lateral de la proteína (82,83). Las estructuras 3D se visualizaron con el sistema de visualización molecular Pymol (84).

5.1.2.3. Dinámica molecular

Se utilizó GROMACS 2019.1 para la simulación de la dinámica molecular del receptor GABA_A sólo y junto al ligando con las mejores características farmacológicas (según el análisis de biodisponibilidad) y de acoplamiento (según el docking molecular), los fármacos Flumazenil y Diazepam (85–87) para esto se empleó Jupyter Notebooks de Dinámica Molecular (88).

La construcción de la topología de GROMACS correspondiente a los ligandos, se realizó utilizando General AMBER Force Field (amberGAFF), primero se agregaron los átomos de hidrógeno que faltaban y luego se minimizó energéticamente el sistema. Para la estructura de la proteína, el campo de fuerza utilizado fue AMBER parm99 con correcciones en el cuerpo proteico y potenciales de torsión de la cadena lateral, agregando átomos de hidrógeno si faltaban. Se utilizó una caja octaédrica con solvente con la proteína centrada en ella y una distancia de proteína a caja de 0,8 nm. La caja se llenó con moléculas de agua y luego se agregaron iones para neutralizar el sistema y alcanzar una concentración iónica de 0.05 Molar. Se realizaron 5000 pasos en términos de minimización de energía utilizando el método de descenso pronunciado para tener una conformación estable. Se realizaron conjuntos canónicos (NVT) y conjuntos isotérmicos isobar (NPT), respectivamente, con una temperatura constante de 300 K para 100 ps para NVT seguida de una temperatura constante de 300 K y una presión constante de 1 atm para 100 ps para NPT. La simulación de dinámica molecular se realizó para 30000 ps. La desviación cuadrática media (RMSd) y el radio de giro (Rgyr) se calcularon mediante g-rmsd y g-Rgyr, respectivamente.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. Caracterización GC del extracto entero metanólico de las hojas de *Annona muricata*

La diversidad potencial de moléculas en la muestra analizada se puede observar en el cromatograma (Figura 22), en el cual se pueden discriminar 19 picos con tiempo de retención identificado. Sin embargo, la gran densidad de señales no permite individualizar todos los compuestos que pueden estar aquí presentes de manera adecuada, lo que sugiere para próximos estudios la necesidad de fraccionamiento por grupos de compuestos, con el fin de identificar aquellos que se puedan encontrar en menor proporción y su información haya sido perdida por la intensidad de concentración de otros.

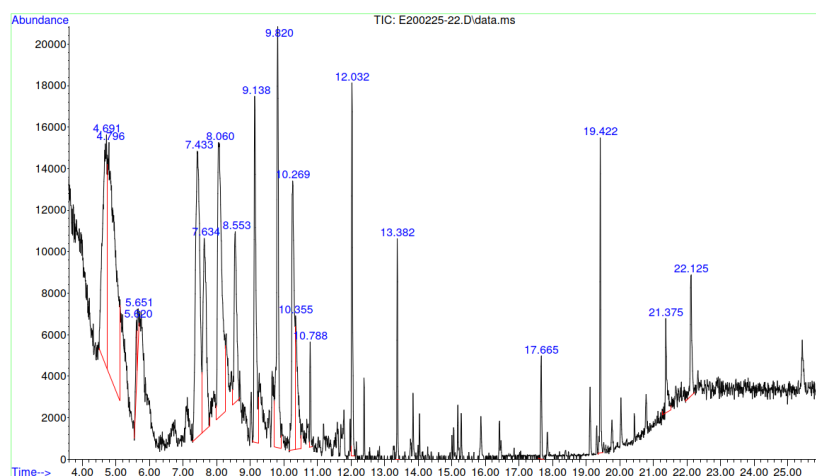


Figura 22. Cromatograma de gases del extracto entero metanólico de las hojas de *A. muricata*

A partir de los picos identificados se procedió a realizar una comparación con las bases de datos NIST14.L y W808.L, logrando identificar 11 posibles moléculas en 6 picos (Tabla 6). Las moléculas identificadas fueron analizadas en cuanto a sus acciones farmacológicas reportadas, junto a observaciones de donde se han reportado incluyendo si se han encontrado en *A. muricata* (Tabla 7). El ácido hexadecanoico, más conocido como ácido palmítico, es el único de los compuestos identificados por GC-MS reportado en *A. muricata*, sin embargo hasta el momento sólo se ha estudiado de él una acción anticancerígena y sus efectos en la nutrición y desarrollo de diabetes tipo 2 (89–91).

Tabla 6. Compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata*

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Nombre IUPAC	Formula química
1	4.694	9.35	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona	C6H8O4
2	4.795	17.15	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona	C6H8O4
3	5.617	0.81	No reconocido	
4	5.651	0.49	No reconocido	
			1-Hexadecanol	C16H34O
5	7.429	12.36	5-Octadeceno	C18H36
			11-Tricoseno	C23H46
6	7.630	6.41	No reconocido	
7	8.058	11.89	No reconocido	
8	8.553	4.30	No reconocido	
9	9.140	6.50	No reconocido	
			1-Heptadeceno	C17H34
10	9.829	7.76	5-Octadeceno	C18H36
			9-Octadeceno	C18H36
11	10.273	6.38	No reconocido	
12	10.357	3.4	No reconocido	
13	10.784	0.87	No reconocido	
14	12.034	3.76	No reconocido	
15	13.385	1.56	Ácido hexadecanoico	C16H32O2
			n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida	C21H14ClNO
16	17.663	1.02	5.alpha-pregn-16-en-20-ona	C21H32O
			Dimetil (undec-2-eniloxi)butoxi-silano	C17H36O2Si
17	19.425	2.68	Dronabinol	C21H30O2
18	21.371	1.28	No reconocido	
19	22.126	2.03	No reconocido	

Por otro lado, llama la atención la identificación del compuesto dronabinol o delta-9-tetrahidrocannabinol, el cual hasta la fecha sólo se reporta en *Cannabis sativa*, y constituye uno de los compuestos derivados de *C. sativa* con uso como medicamento aprobado por la FDA para uso en terapia analgésica, contra la anorexia, náuseas y mareos ocasionados por la quimioterapia en el cáncer (92–94).

Tabla 7. Análisis de la acción y sus fuentes de extracción de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata* (90,92,93,95–100)

Compuesto	Acción Farmacológica	Observaciones de extracción	Especie	Reporte en <i>A. muricata</i>
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona	Antioxidante	Extraído de frutos	<i>Prunus domestica</i>	NR
1-Hexadecanol (Alcohol cetílico)	Emulsificante y desengrasante	Extraído en aceites de todas las plantas.		NR
5-Octadeceno	Antimicrobiana	Extraído de antenas en plantas	<i>Andrographis paniculata</i>	NR
11-tricoseno	Anticancerígena, antioxidante	Extraído de hongo hindú fitopatológico de la planta <i>Rodhodendron</i> sp.	<i>Monochaetia kanpenpis</i>	NR
1-heptadeceno	Sin acción farmacológica conocida	Metabolito de la respiración celular	Plantas	NR
9-octadeceno	Antioxidante	Extraído en aceites de todas las plantas.	<i>Cordia sebestena</i>	NR
Ácido hexadecanoico (Ácido palmítico)	Anticancerígeno	Extraído en aceites de todas las plantas.	Muchas especies	R
5.alpha-pregn-16-en-20-ona	Precursor de la pregnenolona	SD	SD	NR
Dimetil (undec-2-eniloxi)butoxi-silano	Sin acción farmacológica conocida	SD	SD	NR
n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida	Sin acción farmacológica conocida	SD	SD	NR
Dronabinol	Acción psicótica y estimulante del apetito	Canabis	<i>Cannabis sativa</i>	NR

5.2.2. Análisis de biodisponibilidad *in silico*: propiedades fisicoquímicas y farmacológicas

La tabla 8-10 muestra los resultados del análisis *in silico* de las propiedades farmacológicas asociadas al radar de biodisponibilidad obtenidos de la herramienta SWISSADME de los 11 compuestos identificados por GC-MS del extracto entero metanólico de *A. muricata*. Este radar está representado por un hexágono rosa que incluye las propiedades lipofilicidad: Log-P entre -0.7 y 5.0; tamaño (peso molecular): entre 150 y 500 g/mol; polaridad (TPSA): entre 20 y 130 Å; solubilidad (log S): no superior a 6; saturación (fracción de carbonos en hibridación sp³): no inferior a 0.25; y flexibilidad: no más de 9 enlaces rotables (101,102).

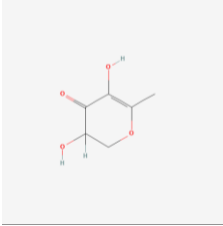
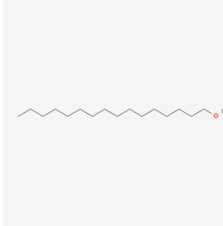
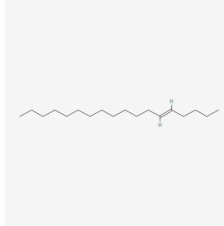
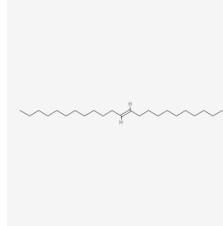
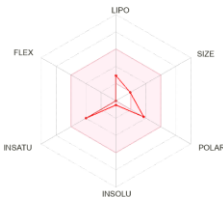
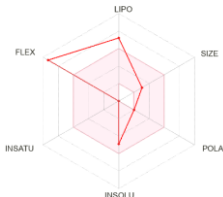
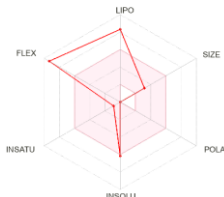
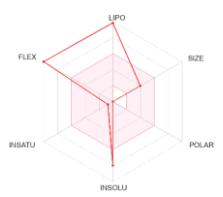
Los compuestos 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona y n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, son los únicos que presentan características químicas que les permiten estar dentro del radar de biodisponibilidad, siendo este último quien presenta mejores características ya que el primero presenta una flexibilidad muy baja al no presentar ningún átomo con capacidad de rotación.

Otros compuestos como 5.alpha-pregn-16-en-20-ona y dronabinol presentan radares en donde la única característica fuera de lo esperado corresponde a su lipofilicidad (6.46 y 6.97 respectivamente).

Por otro lado, los compuestos 5-octadeceno, 11-tricoseno, 1-heptadeceno y 9-octadeceno corresponden a hidrocarburos y presentan un radar de biodisponibilidad muy parecido entre ellos con un número de carbonos rotables, una lipofilicidad y una insolubilidad mayores a los esperados en un fármaco. Compuestos como el 1-hexadecanol, ácido palmítico y el Dimetil (undec-2-eniloxi)butoxi-silano, presentan características similares a los hidrocarburos en cuando a su biodisponibilidad, exceptuando su grado de insolubilidad que se encuentra dentro del hexágono rosa (-4.9, -5.02 y -5.12 respectivamente).

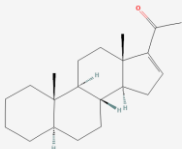
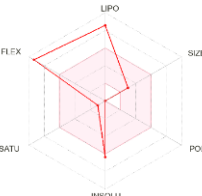
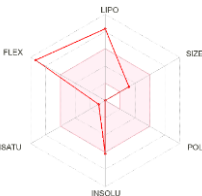
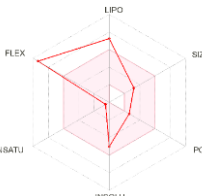
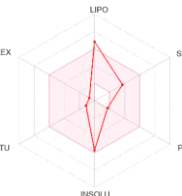
Adicionalmente la tabla 11 presenta las características de los fármacos diazepam y flumazenil como representantes agonista y antagonista (respectivamente) del sitio de unión de alta afinidad de las benzodiazepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A, lugar en donde se evalúo la posible unión de los compuestos encontrados en el extracto entero metanólico de *A. muricata*. El Flumazenil presenta un radar de biodisponibilidad con mejores características que el diazepam ya que este último presenta una insaturación mayor a la ideal en los fármacos (0.12).

Tabla 8. Radar de biodisponibilidad de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero metanólico de las hojas de *A. muricata* parte 1.

Nombre de la molécula	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona	1-Hexadecanol	5-Octadeceno	11-tricoseno
Estructura				
SMILES	<chem>CC1=C(C(=O)C(CO1)O)O</chem>	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCO</chem>	<chem>CCCCCCCCCCC=CCCCC</chem>	<chem>CCCCCCCCCCC=CCCCCCC</chem>
Formula química	C ₆ H ₈ O ₄	C ₁₆ H ₃₄ O	C ₁₈ H ₃₆	C ₂₃ H ₄₆
Peso molecular (g/mol)	144.13	242.44	252.48	322.61
Log Po/w (XLOG P3)	-0.37	7.11	9.03	11.74
Polaridad (Å ²)	66.76	20.23	0.00	0.00
Insolubilidad (LogS (ESOL))	-0.50	-4.90	-6.17	-7.98
Insaturación (Fracción de Csp3)	0.50	1.00	0.89	0.91
Flexibilidad (Número de átomos rotables)	0	14	14	19
Radar de biodisponibilidad				

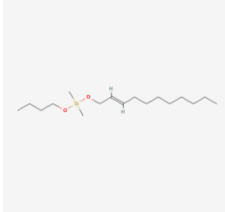
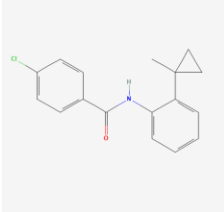
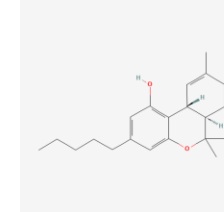
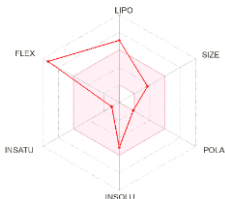
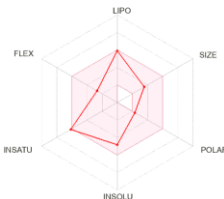
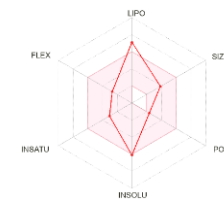
El compuesto con mayor similitud en cuanto a su radar frente a los fármacos evaluados corresponde al n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida con un tamaño similar al de ambos fármacos, una solubilidad y polaridad más cercana al diazepam, y una saturación y flexibilidad similar al Flumazenil, aunque con una lipofilicidad mucho más alta.

Tabla 9. Radar de biodisponibilidad de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata* parte 2.

Nombre de la molécula	1-heptadeceno	9-octadeceno	Ácido palmítico	5.alpha-pregn-16-en-20-ona
Estructura				
SMILES	<chem>CCCCCCCCCCC=C</chem>	<chem>CCCCCCCCC=CCCCCCC</chem>	<chem>CCCCCCCCCCC(=O)O</chem>	<chem>CC(=O)C1=CCC2C1(CCC3C2CCC4C3(CCCC4)C)C</chem>
Formula química	C ₁₇ H ₃₄	C ₁₈ H ₃₆	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C ₂₁ H ₃₂ O
Peso molecular (g/mol)	238.45	252.48	256.42	300.48
Log-P	9.49	9.03	7.17	6.46
Polaridad (Å ²)	0.00	0.00	37.30	17.07
Insolubilidad (LogS (ESOL))	-6.37	-6.17	-5.02	-5.71
Insaturación (Fracción de Csp ³)	0.88	0.89	0.94	0.86
Flexibilidad (Número de átomos rotables)	14	14	14	1
Radar de biodisponibilidad				

Aparte del radar de biodisponibilidad la herramienta SWISSADME también genera información respecto a propiedades farmacológicas de los compuestos como es el caso de su absorción gastrointestinal, paso a través de la barrera hematoencefálica, inhibición de citocromos, absorción cutánea entre otras, la cuales se presentan en la tabla 12-14.

Tabla 10. Radar de biodisponibilidad de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata* parte 3.

Nombre de la molécula	Dimetil (undec-2-eniloxi)butoxi-silano	n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida	Dronabinol
Estructura			
SMILES	<chem>CCCCCCCCC=CCO[Si](C)(C)OCCCC</chem>	<chem>CC1(CC1)C2=CC=CC=C2NC(=O)C3=CC=C(C=C3)Cl</chem>	<chem>CCCCC1=CC(=C2C3C=C(CCC3C(O)C2=C1)(C)C)C)O</chem>
Formula química	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si	C ₁₇ H ₁₆ ClNO	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
Peso molecular (g/mol)	300.55	285.77	314.46
Log-P	6.89	4.84	6.97
Polaridad (Å ²)	18.46	29.10	29.46
Insolubilidad (LogS (ESOL))	-5.12	-4.84	-6.11
Insaturación (Fracción de Csp ³)	0.88	0.24	0.62
Flexibilidad (Número de átomos rotables)	14	4	4
Radar de biodisponibilidad			

Dentro de las características presentadas por la herramienta SwissADME, una alta absorción gastrointestinal y el paso de la barrera hematoencefálica, son dos características importantes a evaluar teniendo en cuenta que el extracto analizado fue empleado por vía intraperitoneal, es decir emulando la acción de un fármaco oral (102) y que se esperaba una acción sobre el sistema nervioso central. Por su parte, los hidrocarburos 5-octadeceno, 11-tricoseno, 1-heptadeceno y 9-octadeceno presentan una baja absorción gastrointestinal y no pasan barrera hematoencefálica,

lo que los hace junto a sus características de biodisponibilidad compuestos que difícilmente pueden actuar como fármacos orales.

Tabla 11. Radar de biodisponibilidad de los fármacos diazepam y flumazenil

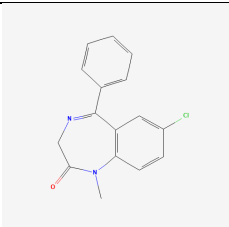
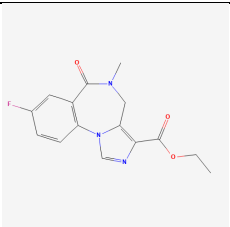
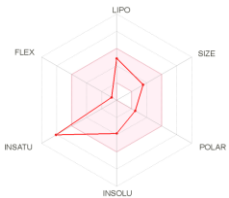
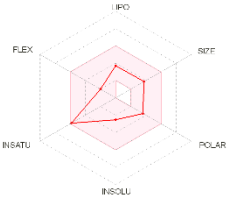
Nombre de la molécula	Diazepam	Flumazenil
Estructura		
SMILES	<chem>CN1C(=O)CN=C(C2=C1C=C(C(=C2)Cl)C3=CC=CC=C3</chem>	<chem>CCOC(=O)C1=C2CN(C(=O)C3=C(N2C=N1)C=CC(=C3)F)C</chem>
Formula química	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ O ₃
Peso molecular (g/mol)	284.74	303,29
Log-P	2.68	2,65
Polaridad (Å ²)	32.67	64,43
Insolubilidad (LogS (ESOL))	-3.87	-2,52
Insaturación (Fracción de Csp ³)	0.12	0,27
Flexibilidad (Número de átomos rotables)	1	3
Radar de biodisponibilidad		

Tabla 12. Resultados SwissADME de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata*, diazepam y flumazenil parte 1.

Descriptor	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona	1-Hexadecanol	5-Octadeceno	11-Tricoseno	1-heptadeceno
Absorción gastrointestinal	Alta	Alta	Baja	Baja	Baja
Permeabilidad de la barrera hematoencefálica	No	Si	No	No	No
Sustrato P-gp	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	No	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2C19	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2C9	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2D6	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP3A4	No	No	No	No	No
Log Kp (permeabilidad cutánea) (cm/s)	-7.44	-2.73	-1.43	0.07	-1.02
Lipinki	Si	Si	Si	Si	Si
Ghose	No	Si	No	No	No
Veber	Si	No	No	No	No
Egan	Si	Si	No	No	No
Muegge	No	No	No	No	No
Puntaje de biodisponibilidad	0.85	0,55	0,55	0.55	0,55
PAINP	0	0	0	0	0
Brenk	0	0	1	1	1
Semejanza al plomo	No	No	No	No	No
Accesibilidad sintética	3.6	2.29	3.49	4.08	2.71

Por otro lado, los compuestos 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona y dimetil (undec-2-enilo)butoxi-silano, si bien tienen una alta absorción gastrointestinal, no pasan la barrera hematoencefálica. Por el contrario, el resto de los compuestos encontrados en el extracto (ácido palmítico, 5.alpha-pregn-16-en-20-ona, n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y dronabinol) junto a los fármacos analizados, si presentan las características requeridas para la llegada al sistema nervioso central de un fármaco oral.

Tabla 13. Resultados SwissADME de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata*, diazepam y flumazenil parte 2.

Descriptor	9-octadeceno	Ácido palmítico	5.alpha-pregn-16-en-20-ona	Dimetil (undec-2-eniloxi)butoxi-silano
Absorción gastrointestinal	Baja	Alta	Alta	Alta
Permeabilidad de la barrera hematoencefálica	No	Si	Si	No
Sustrato P-gp	No	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	Si	Si	No	Si
Inhibidor de CYP2C19	No	No	Si	No
Inhibidor de CYP2C9	No	Si	Si	No
Inhibidor de CYP2D6	No	No	No	No
Inhibidor de CYP3A4	No	No	No	No
Log Kp (permeabilidad cutánea) (cm/s)	-1.43	-2.77	-3.55	-3.24
Lipinski	Si	Si	Si	Si
Ghose	No	Si	Si	No
Veber	No	No	Si	No
Egan	No	Si	Si	Si
Muegge	No	No	No	No
Puntaje de biodisponibilidad	0,55	0.85	0.55	0.55
PAINP	0	0	0	0
Brenk	1	0	0	2
Semejanza al plomo	No	No	No	No
Accesibilidad sintética	3.49	2.31	5.09	4.81

5.2.3. Acoplamiento molecular

En los 11 compuestos encontrados en el extracto entero metanólico de las hojas de *A. muricata* junto a los fármacos de referencia fue evaluado el “docking score” de unión al sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A a través de acoplamiento molecular. La tabla 15 presenta los tres “docking score” más altos obtenidos por compuestos tras la realización de 10 formas estructurales por tres repeticiones de cada compuesto (es decir que se obtuvieron un total de 30 conformaciones), además se presenta el promedio de la energía con el fin de establecer el compuesto con mejor afinidad al sitio de unión evaluado. Este “docking score” presenta la energía de acoplamiento calculada como la diferencia entre los estados proteína-ligando y proteína libre, dando información de la energía libre de unión, la entalpía y la entropía siendo una representación de la termodinámica de la unión (103).

Tabla 14. Resultados SwissADME de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero de las hojas de *A. muricata*, diazepam y flumazenil parte 3.

Descriptor	n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida	Dronabinol	Diazepam	Flumazenil
Absorción gastrointestinal	Alta	Alta	Alta	Alta
Permeabilidad de la barrera hematoencefálica	Si	Si	Si	Si
Sustrato P-gp	No	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	Si	No	Si	No
Inhibidor de CYP2C19	Si	Si	Si	No
Inhibidor de CYP2C9	Si	Si	Si	No
Inhibidor de CYP2D6	Si	Si	Si	No
Inhibidor de CYP3A4	Si	No	Si	No
Log Kp (permeabilidad cutánea) (cm/s)	-4.61	-3.27	-5,91	-7,44
Lipinski	Si	Si	Si	Si
Ghose	Si	No	Si	Si
Veber	Si	Si	Si	Si
Egan	Si	Si	Si	Si
Muegge	Si	No	Si	Si
Puntaje de biodisponibilidad	0.55	0.55	0,55	0,55
PAINP	0	0	0	0
Brenk	0	1	0	0
Semejanza al plomo	No	No	Si	Si
Accesibilidad sintética	1.87	4.27	3	3,06

El fármaco diazepam presentó el mejor “docking score”, lo cual es altamente coherente con el hecho de estar evaluando el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas. Seguido de él se presentaron los compuestos n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y dronabinol. Por su parte, el Flumazenil presenta un “docking score” bastante bajo en comparación al diazepam. Llama la atención el “docking score” del compuesto n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, el cuál coincide con las mejores características de biodisponibilidad, absorción gastrointestinal y paso de la barrera hematoencefálica con respecto al resto de compuestos identificados. Sin embargo, hasta el momento no se presentan reportes de una posible acción farmacológica de n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, aunque si se ha hecho comprobación de una buena identificación de este por GC-MS (104).

Tabla 15. Resultados de docking molecular de compuestos identificados a partir de GC-MS del extracto entero metanólico de las hojas de *A. muricata* y los fármacos Diazepam y Flumazenil.

Molécula	Docking score (Kcal/mol)			
	1	2	3	Media
Diazepam	-10,3	-10,3	-10,3	-10,3
n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida	-10,1	-10,1	-10,1	-10,1
Dronabinol	-9,6	-9,6	-10,3	-9,8
Flumazenil	-8,5	-8,5	-8,5	-8,5
5.alpha-pregn-16-en-20-ona	-7,6	-7,6	-7,6	-7,6
11-Tricoseno	-7,6	-7,4	-7,4	-7,5
9-Octadeceno	-7	-7,2	-7,3	-7,2
Ácido palmítico	-7,1	-7,1	-7,3	-7,2
5-Octadeceno	-7,2	-6,9	-7	-7,0
1-Hexadecanol	-7,1	-6,8	-7	-7,0
1-Heptadeceno	-6,9	-6,7	-7	-6,9
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-(4H)-piran-4-ona	-6,3	-6,3	-6,2	-6,3
Dimetil (undec-2-eniloxi)butoxi-silano	-6,5	-6	-5,5	-6,0

5.2.4. Interacciones y dinámica molecular

Teniendo en cuenta los resultados de biodisponibilidad, el grado de absorción gastrointestinal, el paso de la barrera hematoencefálica y el “docking score”, se seleccionó el compuesto n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida con el fin de reconocer sus interacciones moleculares con el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas y el comportamiento de su unión a lo largo de 30000 ps. Además, este compuesto genera un alto interés debido a la falta de información sobre el mismo. Adicionalmente, junto a este se analizaron los fármacos Diazepam y Flumazenil con el fin de comparar sus interacciones.

La figura 23 presenta las interacciones moleculares en 2D de los complejos receptor GABA_A-ligando en la posición con mejor “docking score” para los compuestos n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, diazepam y flumazenil, con el sitio de unión de alta afinidad a las benzodiazepinas, la figura 24 la presenta en 3D y la tabla 16 las resume en aquellas con distancia menor a 4.0 Å.

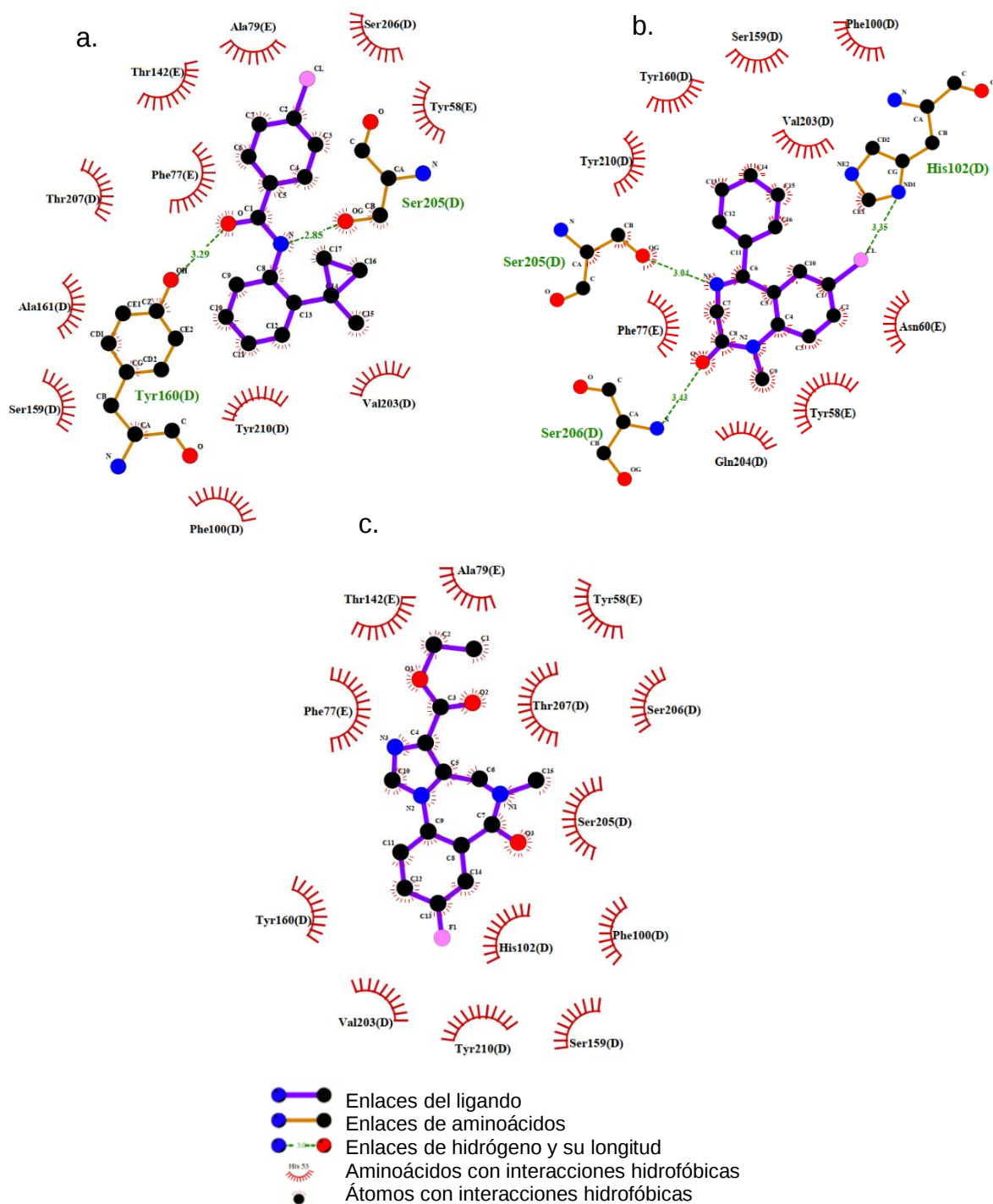


Figura 23. Interacciones moleculares receptor GABA_A-ligando en 2D de acuerdo a LigPlot++(82). a. n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, b. Diazepam y c. Flumazenil.

El sitio de unión de alta afinidad a las benzodiazepinas localizado en el dominio extracelular del receptor GABA_A se encuentra entre las subunidades $\alpha 1$ - $\gamma 2$, siendo la subunidad $\alpha 1$ donde se presenta el mayor número y tipo de interacciones moleculares en los tres compuestos evaluados.

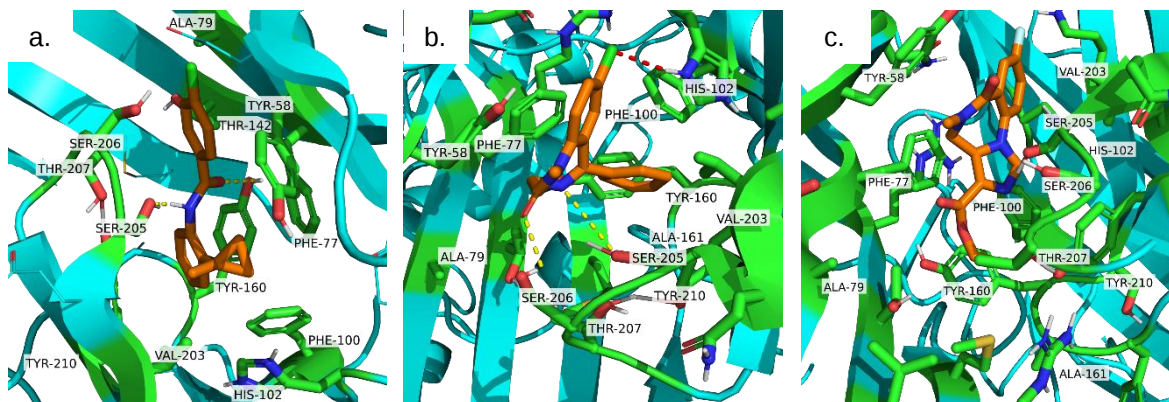


Figura 24. Interacciones moleculares receptor GABA_A-ligando en 3D visualizadas en pymol (84). a. n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, b. Diazepam y c. Flumazenil.

En $\alpha 1$ se presentan interacciones con menos de 4 Å de distancia de tipo hidrofóbicas, Π , enlaces de hidrógeno y un enlace halógeno. El principal tipo de interacción observada en los tres compuestos corresponde a las de tipo hidrofóbicas donde el compuesto con mayor número corresponde al n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida. En este tipo de interacciones se destacan las establecidas por los ligandos con los residuos de aminoácidos Phe100, Tyr160 y Val203, debido a que se presentan en los 3 compuestos evaluados; por su parte n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y Flumazenil presentan este tipo de interacciones también con el residuo Thr207.

Si bien las interacciones hidrofóbicas son muy importantes, los otros tipos de interacciones encontradas producen una mayor estabilidad en los complejos receptor GABA_A-ligando producidos. De hecho los enlaces de hidrógeno son considerados más estables que las interacciones Π y altamente importantes en el establecimiento de uniones de un fármaco a su diana (105). En $\alpha 1$, tanto diazepam como n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida presentan dos enlaces de hidrógeno, ambos se unen de esta forma a el residuo Ser205, además diazepam se une a Ser206 y n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida a Tyr160, lo que permite relacionarlos con una posible actividad anticrisis, debido a que este efecto farmacológico se reporta para este tipo de subunidad α (40,41).

Tabla 16. Interacciones moleculares receptor GABA_A-ligando.

Interacciones	Residuo	AA	Distancia Diazepam (Å)	Distancia n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida (Å)	Distancia Flumazenil (Å)
Hidrofóbicas	100D	PHE	3.69	3.56, 3.61	3.60
Enlace halógeno	102D	HIS	3.35	np	np
Hidrofóbicas	160D	TYR	3.57	3.62	3.94
Enlace de hidrógeno	160D	TYR	np	3.29	np
Hidrofóbicas	203D	VAL	3.89	3.62	3.73
Enlace de hidrógeno	205D	SER	3.04	2.85	np
Enlace de hidrógeno	206D	SER	3.43	np	np
Hidrofóbicas	207D	THR	np	3.79	3.79
Hidrofóbicas	210D	TYR	3.80, 3.60	np	np
Π	210D	TYR	np	3.95	3.80
Hidrofóbicas	58E	TYR	3.51	3.36	np
Hidrofóbicas	77E	PHE	3.29	3.58, 3.7, 3.75	np
Hidrofóbicas	79E	ALA	np	3.87	3.95
Hidrofóbicas	142E	THR	np	3.44	np

Además de las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno establecidos con $\alpha 1$, diazepam también presenta un enlace halógeno con el residuo His102, el cuál refuerza la estabilidad de su unión al sitio evaluado, como benzodicepina que es.

Por otro lado, n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y flumazenil presentan una interacción tipo Π con el residuo Tyr210, la cuál es de suma importancia para este último ligando debido a que corresponde al único tipo de interacción de alta estabilidad presente en este compuesto.

En cuanto a $\gamma 2$, todas las interacciones aquí presentes son de tipo hidrofóbicas, encontrando interacciones de menos de 4Å entre el diazepam y n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida con el residuo Phe77; de n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y Flumazenil con Ala79; y de sólo n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida con Thr142.

Todas las interacciones encontradas aquí para el receptor de GABA_A con el diazepam y flumazenil ya se han reportado en estudios con uso de Crio-microscopía electrónica, lo que valida los resultados *in silico* aquí encontrados (40,54,106,107).

Para estudiar la estabilidad de n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, Flumazenil y Diazepam con el receptor GABA_A, y GABA_A sólo, sus complejos proteína-ligando y la proteína sola fueron sometidos a un estudio de dinámica molecular donde se calculó su RMSD y Rgyr. El análisis RMSD mide la diferencia entre el esqueleto de la proteína desde la conformación de una estructura inicial hasta la posición final, encontrando altas fluctuaciones de RMSD cuando la proteína es inestable (44). De acuerdo con lo anterior, el complejo GABA_A- n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida y GABA_A-Flumazenil presenta enlaces más estables a lo largo de las 30.000 ps evaluadas en comparación con el complejo GABA_A-diazepam. Sin embargo, al comparar los complejos evaluados con la proteína sin ligando se encontró gran similitud en el comportamiento de la RMSD de esta última con el complejo GABA_A-diazepam (Figura 25).

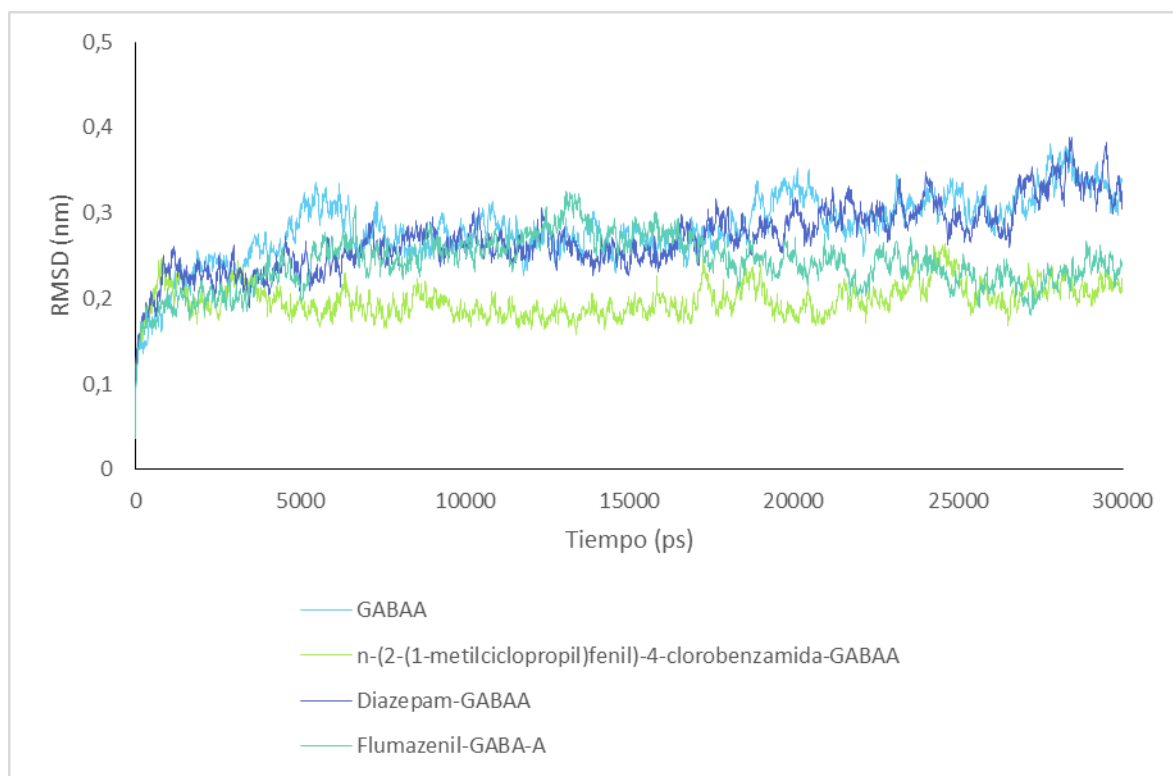


Figura 25. RMSD del receptor GABA_A sin ligando y en los complejos con n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, Flumazenil y Diazepam

El radio de giro de GABA_A-Diazepam, complejo GABA_A-Flumazenil y GABA libre fluctúa de manera similar entre 4,37 a 4,41 nm, estabilizándose en alrededor de

50ps entre, por el contrario, el complejo GABAA- n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida valores menores de giro, presentando la mayor parte del tiempo evaluado un Rgyr entre 4.36 y 4.38nm, sin embargo, inicialmente y entre los 20000 y 250000 ps su comportamiento es similar al resto de complejos y a la proteína sin unión (Figura 26). Estas Rgyr menor en el complejo GABAA-n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida permite elucidar una mayor estabilidad del complejo respecto a los demás compuestos debido a que el radio de giro es una medida de la compacidad y el comportamiento de plegamiento de una proteína, ligado a su estructura terciaria y al estado general de conformación (108).

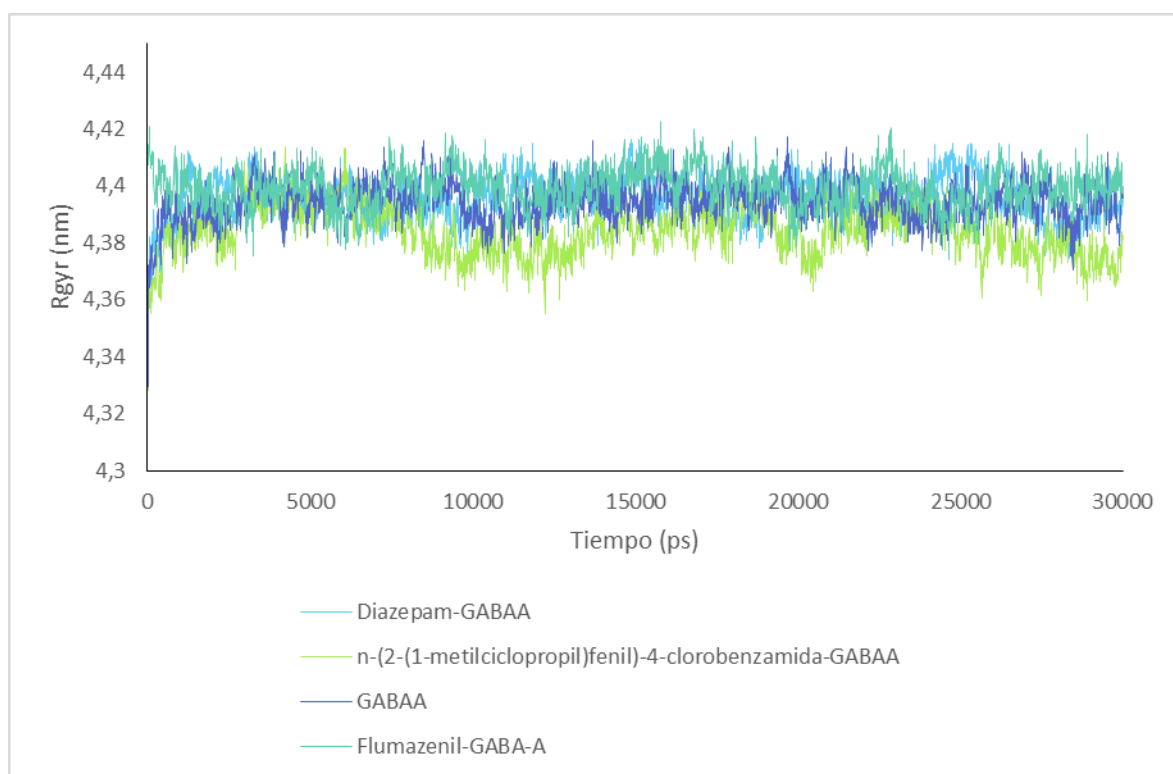


Figura 26. Rgyr del receptor GABAA sin ligando y en los complejos con n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, Flumazenil y Diazepam.

Las propiedades que tiene n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida con dos enlaces de hidrógeno, una interacción π y 11 interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos del sitio de unión de alta afinidad a la benzodiazepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A, y su estabilidad a través del tiempo según la simulación de dinámica molecular hacen a este compuesto un candidato para la

evaluación de efectos *in vitro* de su potencial sobre el receptor GABA_A y su posible acción anticrisis *in vivo* en modelos animales.

5.3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a la revisión del “docking score”, las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas y las interacciones moleculares que incluyen alta estabilidad, número y tipo de interacciones similares al diazepam, se puede establecer a n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida como un compuesto con una posible acción farmacológica sobre el receptor GABA_A en su sitio de unión de alta afinidad a la benzodiazepinas, el cuál debe ser aislado o sintetizado con el fin evaluar su acción electrofisiológica sobre el receptor *in vitro* y sobre modelos animales de epilepsia *in vivo* y de esta forma lograr establecer una posible acción sobre el sistema nervioso central que pueda mitigar los efectos de una crisis epiléptica.

A pesar de los resultados obtenidos para el compuesto n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida es importante tener en cuenta que el extracto empleado presentó una gran variedad de compuestos sin identificar debido tanto a las bases de datos empleadas como al número elevado de compuestos que se pueden enmascarar entre sí, por lo que resulta importante una evaluación que abarque un mayor número de compuestos presentes en *A. muricata* y de esta manera identificar otras posibles moléculas con acción anticrisis.

6. CAPÍTULO 3.

Análisis del acoplamiento molecular de metabolitos secundarios de *Annona muricata* en el sitio de unión extracelular de benzodiazepinas del receptor GABA-A.

6.1. METODOLOGÍA

Para conocer el posible efecto farmacológico de compuestos reportados en extractos de *A. muricata* y su posible acción anticrisis, se llevaron a cabo pruebas *in silico* que incluyeron el acoplamiento molecular con el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A y a partir de sus resultados, el análisis de biodisponibilidad y las interacciones moleculares de los compuestos con mejor energía de acoplamiento. De acuerdo con los resultados anteriores, se realizó la dinámica molecular del complejo GABA_A-con el compuesto con mejores características energéticas, de interacción y de biodisponibilidad, comparado con los fármacos Diazepam y Flumazenil.

6.1.1. Selección de ligandos

Se realizó una consulta de las bases de datos de literatura biomédica (Pubmed, Elsevier, Google Scholar) para seleccionar los compuestos presentes en los extractos de *A. muricata*. La búsqueda abarcó toda la literatura disponible hasta enero de 2021. Posteriormente, se seleccionaron los compuestos que presentaran identificación en Pubchem; adicionalmente se analizaron los medicamentos flumazenil y diazepam (como antagonista y agonista del sitio receptor de alta afinidad para las benzodiazepinas en el receptor GABA_A, respectivamente).

6.1.2. Análisis *in silico* de compuestos reportados en extractos de *A. muricata*

Para conocer posible efecto farmacológico de los compuestos seleccionados y su posible acción anticrisis, se llevaron a cabo pruebas *in silico* que incluyen el análisis de biodisponibilidad de las moléculas seleccionadas, el acoplamiento molecular, el análisis de interacciones moleculares y de farmacóforo de las moléculas con mejores características energéticas y de biodisponibilidad; y a partir de lo anterior la

dinámica molecular del compuesto con mejores características de interacción comparado con los fármacos Diazepam y Flumazenil.

La metodología que se empleó para el desarrollo de las pruebas de biodisponibilidad, el acoplamiento molecular, las interacciones y la dinámica moleculares se presentó en el apartado 5.1.3.

6.1.2.1. *Análisis de farmacóforo*

Los seis ligandos con mejor puntaje de acoplamiento y diazepam se superpusieron para crear un farmacóforo de características compartidas utilizando LigandScout 4.4. Las interacciones consideradas fueron las hidrofóbicas (representada como H, restricción de distancia de 1,0 a 5,9 Å); los donantes (representados como HBD, restricción de distancia de 2,2 a 3,8 Å) y los aceptores de enlaces de hidrógeno (representado como HBA, restricción de distancia de 2,2 a 3,8 Å); las interacciones ionizables positivas (representada como PI, restricciones de distancia de 1,5 a 5,5 Å con ionizable negativo y de 1,5 a 10,0 Å con anillo aromático), entre otras.

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. Selección, análisis de ligandos y acoplamiento molecular

Las bases de datos de literatura científica biomédica consultadas permitieron establecer 115 compuestos de *A. muricata* para el desarrollo del análisis *in silico* de la acción de estos en el receptor GABA_A. La Tabla 17-20 presenta los 115 compuestos, su puntaje de acoplamiento en el sitio de unión a benzodiazepinas de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA-A, el grado de absorción gastrointestinal (GI) y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB).

La tabla 21 muestra los compuestos con puntajes de acoplamiento molecular más bajos (Kcal/mol) que el diazepam en el sitio de unión de las benzodiazepinas de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA-A, el agonista diazepam y el antagonista flumazenil. Además, la tabla presenta el tipo de molécula, la carga y los usos reportados.

Los primeros seis compuestos con el “docking score” más alto son alcaloides derivados de las quinolinas. Entre estos compuestos sólo la annonaina, nornuciferina y asimilobina han sido reportados con efectos en el sistema nervioso, específicamente en los receptores 5-HT_{1A}.

Para estos alcaloides quinolínicos, además de los fármacos diazepam y flumazenil, se visualizó y analizó su estructura (Figura 27), sus propiedades de farmacóforo, su biodisponibilidad *in-silico* (propiedades fisicoquímicas y similitud a fármacos) y sus interacciones moleculares en el complejo GABA_A-ligando, formado a partir del acoplamiento.

El análisis de farmacóforo realizado se basó en las estructuras de los ligandos seleccionados (alcaloides quinolínicos, diazepam y flumazenil) para conocer el potencial de unión de estos compuestos. Sin embargo, el flumazenil corresponde a una estructura muy diferente al resto de los compuestos, por lo que no se logró un solapamiento, lo que hizo que se descartara del análisis (Figura 28).

Los siete compuestos evaluados presentan en común la presencia de dos anillos aromáticos, involucrando todos los átomos de carbono de uno de estos anillos en una interacción hidrofóbica (H). Además, en el otro anillo aromático, solo un carbono está involucrado en este mismo tipo de interacción. Adicionalmente, todos los compuestos tienen un átomo de nitrógeno con un área ionizable positiva (PI).

Tabla 17. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de *A. muricata* en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA_A.

Compuesto	Docking score (Kcal/mol)				GI	BBB
	1	2	3	Media		
Annonaina	-12	-12	-12	-12,0	Alta	Si
Xylopina	-11,4	-11,4	-11,4	-11,4	Alta	Si
Isolaurelina	-11,2	-11,2	-11,2	-11,2	Alta	Si
Nornuciferina	-10,5	-10,5	-10,5	-10,5	Alta	Si
Asimilobina	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4	Alta	Si
Annonamina	-10,3	-10,3	-10,3	-10,3	Alta	Si
Atherosperminina	-10,3	-10,3	-10,3	-10,3	Alta	Si
Nicotiflorina	-10,3	-10,3	-10,3	-10,3	Baja	No
Diazepam	-10,3	-10,3	-10,3	-10,3	Alta	Si
Ácido 4-feruloyl-5-caffeoilquinico	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	Baja	No
Quercetin	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	Alta	No
Kaempferol 3-O-robinobiosida	-10,1	-10,1	-10,1	-10,1	Baja	No
Kaempferol	-9,9	-9,9	-9,9	-9,9	Alta	No
Quercetin 3-O-robinobiosida	-9,9	-9,9	-9,9	-9,9	Baja	No
Annopentocin B	-9,4	-10,1	-10,1	-9,9	Baja	No
Quercetin 3-O-glucosida	-9,8	-9,8	-9,8	-9,8	Baja	No
Rutin	-9,8	-9,8	-9,8	-9,8	Baja	No
cis-Uvariamicina IV	-9,7	-9,9	-9,6	-9,7	Baja	No
Norcorydina	-9,7	-9,7	-9,7	-9,7	Alta	Si
Estefarina	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6	Alta	Si
cis-Annomontacina	-9,7	-9,7	-9,4	-9,6	Baja	No
Coreximina	-9,4	-9,5	-9,5	-9,5	Alta	Si
Coclaurina	-9,4	-9,4	-9,4	-9,4	Alta	Si
Reticulina	-9,4	-9,4	-9,4	-9,4	Alta	Si
Annocatalina	-9,1	-9,2	-9,8	-9,4	Baja	No
Corossolina	-9,2	-9	-9,5	-9,2	Baja	No
Anomurina	-9,1	-9,1	-9,1	-9,1	Alta	Si
Annoreticuina	-9,1	-8,7	-9,2	-9,0	Baja	No
Donhexocina	-8,9	-8,9	-8,8	-8,9	Baja	No
Muricapentocina	-8,9	-8,8	-8,9	-8,9	Baja	No
Muricina E	-8,8	-8,7	-8,8	-8,8	Baja	No
Annopentocina A	-8,7	-8,9	-8,6	-8,7	Baja	No
Xylomaticina	-9,1	-9,1	-8	-8,7	Baja	No
Ácido clorogénico	-8,7	-8,7	-8,7	-8,7	Baja	No
Epicatequina	-8,6	-8,7	-8,7	-8,7	Alta	No
Muricina F	-8,5	-8,5	-8,9	-8,6	Baja	No

Tabla 18. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de *A. muricata* en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA_A.

Compuesto	Docking score (Kcal/mol)				GI	BBB
	1	2	3	Media		
cis-Annonacin-10-one	-8,6	-8,8	-8,5	-8,6	Baja	No
Murihexocina A	-8,3	-8,5	-8,9	-8,6	Baja	No
Ácido Neoclorogenico	-8,5	-8,5	-8,5	-8,5	Baja	No
Annohexocina	-8,5	-8,8	-8,2	-8,5	Baja	No
Flumazenil	-8,5	-8,5	-8,5	-8,5	Alta	Si
Khellina	-8,5	-8,5	-8,5	-8,5	Alta	Si
Muricina A	-8,7	-8,1	-8,6	-8,5	Baja	No
Muricina D	-8,5	-8,4	-8,5	-8,5	Baja	No
cis-Goniothalamicina	-8,6	-8	-8,8	-8,5	Baja	No
Muricina I	-8,1	-8,7	-8,5	-8,4	Baja	No
Gigantetrocena	-8,7	-8,1	-8,2	-8,3	Baja	No
Quercetin 3-O-neohesperidosida	-8,3	-8,3	-8,3	-8,3	Baja	No
cis-Uvariamicina IB	-8,6	-8,3	-7,9	-8,3	Baja	No
Roseosida	-8,2	-8,2	-8,2	-8,2	Baja	No
Annomuricata B	-8,2	-8,2	-8,2	-8,2	Baja	No
Muricina H	-7,8	-8,2	-8,5	-8,2	Baja	No
Annonacina	-8,2	-8,3	-7,9	-8,1	Baja	No
Muricina G	-8,3	-8	-8	-8,1	Baja	No
Annonacina A	-8	-8,2	-8,1	-8,1	Baja	No
Murisolina	-8,1	-8,1	-8	-8,1	Baja	No
Arianacina	-8,2	-8,1	-7,9	-8,1	Baja	No
Montecristina	-7,9	-8,1	-8	-8,0	Baja	No
9-Oxoannoreticuina	-8	-8,1	-7,8	-8,0	Baja	No
Panatellina	-7,9	-7,7	-8,3	-8,0	Baja	No
Muricatocina B	-8,2	-7,7	-8	-8,0	Baja	No
Murihexocina C	-7,9	-7,9	-8,1	-8,0	Baja	No
Annopentocina C	-7,9	-7,8	-8,2	-8,0	Baja	No
Javoricina	-7,8	-8,1	-8	-8,0	Baja	No
Gigantetrocinona	-8,1	-8	-7,7	-7,9	Baja	No
Annonacina	-8	-7,9	-7,9	-7,9	Baja	No
Goniothalamicina	-7,8	-8,2	-7,8	-7,9	Baja	No
cis-Annonacina	-8,1	-8,1	-7,6	-7,9	Baja	No
Epoxymurina-A	-7,6	-8,2	-8	-7,9	Baja	No
Isoannonacina	-7,8	-7,9	-8,1	-7,9	Baja	No
Longifolicina	-8,2	-7,5	-8,1	-7,9	Baja	No
Muricina C	-7,9	-8	-7,8	-7,9	Baja	No

Tabla 19. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de *A. muricata* en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA_A.

Compuesto	Docking score (Kcal/mol)				GI	BBB
	1	2	3	Media		
Annomuricin B	-8	-7,7	-8	-7,9	Baja	No
Epomusenin A	-7,6	-8,1	-7,9	-7,9	Baja	No
Gigantetrocin A	-7,8	-7,6	-8,2	-7,9	Baja	No
Annomuricin A	-8	-7,7	-7,8	-7,8	Baja	No
Annomuricin C	-7,9	-8	-7,6	-7,8	Baja	No
Annomuricin E	-7,9	-7,6	-8	-7,8	Baja	No
Annomontacin	-8,2	-7,9	-7,4	-7,8	Baja	No
Chatenaytrienin 1	-7,9	-7,8	-7,8	-7,8	Baja	No
Muricatetrocin A	-8	-7,9	-7,6	-7,8	Baja	No
Muricatocin C	-8,1	-7,7	-7,6	-7,8	Baja	No
Blumenol C	-7,8	-7,8	-7,8	-7,8	Alta	Si
cis-Corossolone	-7,7	-8	-7,7	-7,8	Baja	No
cis-Reticulatacin-10-one	-7,8	-7,6	-8	-7,8	Baja	No
Muricin B	-7,8	-8,3	-7,2	-7,8	Baja	No
Muridienin 3	-7,5	-7,9	-7,9	-7,8	Baja	No
Corossolone	-8,1	-7,3	-7,9	-7,8	Baja	No
Cohibin B	-7,8	-7,8	-7,6	-7,7	Baja	No
Isoannonacin	-7,7	-7,7	-7,7	-7,7	Baja	No
Epomuricenin A	-7,6	-7,7	-7,8	-7,7	Baja	No
Muridienin 4	-7,5	-7,7	-7,8	-7,7	Baja	No
Muricatenol	-7,5	-8,1	-7,4	-7,7	Baja	No
Chatenaytrienin 2	-7,5	-7,5	-7,9	-7,6	Baja	No
Gigantetrocin	-7,5	-7,9	-7,5	-7,6	Baja	No
cis-Solamin	-7,8	-7,5	-7,5	-7,6	Baja	No
Methyl 4-hydroxycinnamate	-7,6	-7,6	-7,6	-7,6	Alta	Si
Muricatacin	-7,6	-7,6	-7,6	-7,6	Alta	Si
Cis-Reticulatacin-10-one B	-7,6	-7,6	-7,5	-7,6	Baja	No
Chatenaytrienin 3	-7,4	-7,5	-7,7	-7,5	Baja	No
cis-Reticulatacin-10-one A	-7,6	-7,5	-7,5	-7,5	Baja	No
Muricadienin	-7,4	-7,7	-7,5	-7,5	Baja	No
Cohibin A	-7,3	-7,6	-7,5	-7,5	Baja	No
Cohibin D	-7,3	-7,9	-7,1	-7,4	Baja	No
Sabadelin	-7,3	-7,4	-7,4	-7,4	Baja	No
Corepoxylone	-7,4	-7,3	-7,3	-7,3	Baja	No
Epomuricenin B	-7,4	-7,3	-7,2	-7,3	Baja	No
(+)-Epiloliolide	-7,2	-7,2	-7,2	-7,2	Alta	Si

Tabla 20. Docking score, grado de absorción gastrointestinal (GI) y permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) de compuestos reportados en extractos de *A. muricata* en el sitio de benzodiazepina de alta afinidad (ECD) en el receptor GABA_A.

Compuesto	Docking score (Kcal/mol)				GI	BBB
	1	2	3	Media		
Cohibin C	-7,3	-7	-7,3	-7,2	Baja	No
Ioliolide	-7,1	-7,1	-7,1	-7,1	Alta	Si
Epomusenin B	-7,3	-6,7	-7,1	-7,0	Baja	No
Vomifoliol	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	Alta	Si
Gallic acid	-6,7	-6,7	-6,7	-6,7	Alta	No
Turpinionoside B	-6,7	-6,7	-6,7	-6,7	Baja	No
Annoionol A	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	Alta	Si
Annoionoside	-6,5	-6,5	-6,5	-6,5	Baja	No
Citroside A	-6,3	-6,3	-6,3	-6,3	Baja	No
Annoionol B	-5,7	-5,7	-5,7	-5,7	Alta	No

Tabla 21. Docking scores, farmacocinética y bioactividad de compuestos reportados para *A. muricata* con menor docking scores que el diazepam en el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA-A.

Nombre químico	Tipo de moléculas	Carga	Docking score (Kcal/mol)	Bioactividad reportada (53)
Annonaina	Alcaloide aporfínico	+1	-12,0	Antidepresivo, Anti-plasmodium, Inhibidor del receptor de dopamina
Xylopina	Alcaloide Isoquinolínico	+1	-11,4	NR
Isolaurelina	Alcaloide aporfínico	+1	-11,2	Citotóxico
Nornuciferina	Alcaloide Isoquinolínico	+1	-10,5	Antidepresivo/ <i>in vitro</i> NIH-3T3
Asimilobina	Alcaloide aporfínico	+1	-10,4	Antidepresivo, Citotóxico
Annonamina	Alcaloide aporfínico	+1	-10,3	Citotóxico
Atherosperminina	Alcaloide aporfínico	+1	-10,3	NR
Nicotiflorina	Fenol flavonoide	0	-10,3	Antioxidante
Flumazenil	Derivado de imidazo-benzodiazepina	0	-8,5	Antagonista de benzodiazepina
Diazepam	Benzodiazepina	0	-10,3	Anticonvulsivante, Ansiolítico, Sedativo

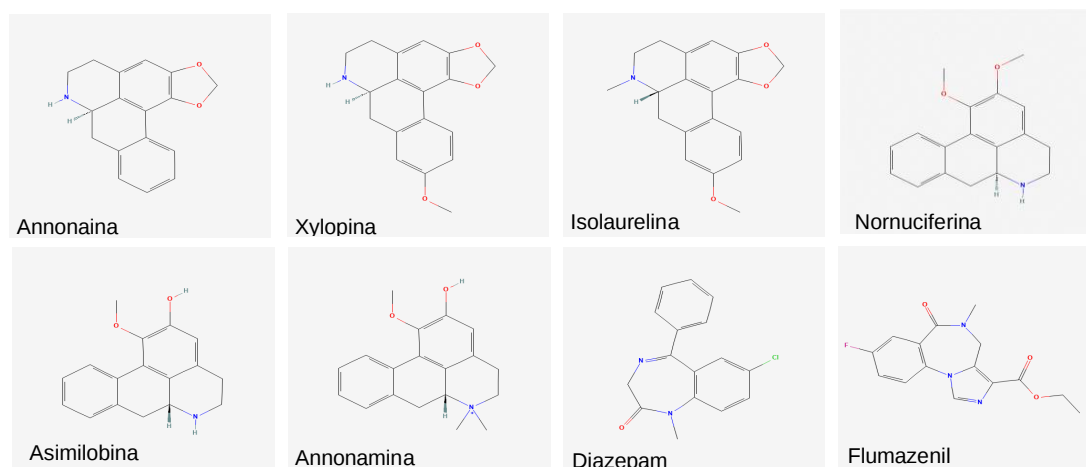


Figura 27. Estructura de los alcaloides quinolínicos de *A. muricata* con mayor docking score en el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA-A, Diazepam y Flumazenil.

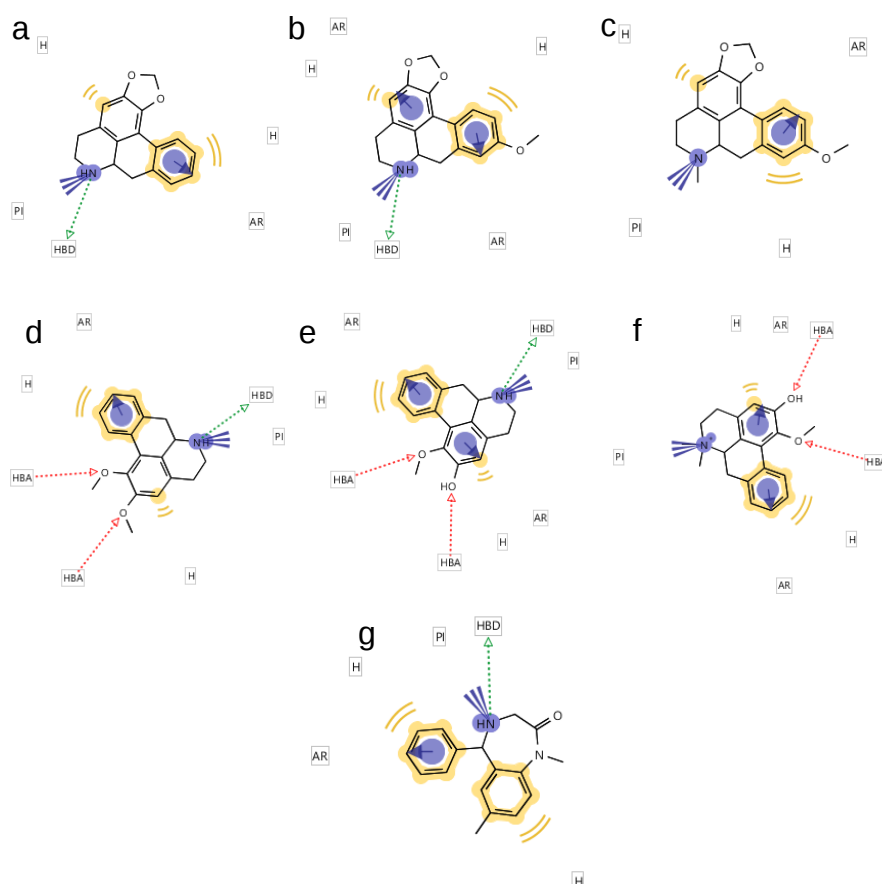


Figura 28. Análisis de farmacóforo basado en las estructuras de alcaloides quinolínicos de *A. muricata* con mejor docking score en el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA_A y diazepam. A. Annonaina, b. Xylopina, c. Isolaurelina, d. Nornuciferina, e. Asimilobina, f. Annonamina y g. Diazepam.

Por otro lado, en cinco de los compuestos (asimilobina, nornuciferina, xylopina, annonaina y diazepam) el átomo de nitrógeno se presenta como donante en un enlace de hidrógeno (HBD), ya que este tipo de átomo es fuertemente electronegativo permitiendo que un átomo aceptor con un par solitario de electrones se una a él por un enlace de hidrógeno.

Además, en tres compuestos (anonamina, asimilobina y nornuciferina) los átomos de oxígeno están presentes como aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA), ya que estos átomos tienen dos electrones solitarios. Tanto los átomos donantes como los aceptores en los enlaces de hidrógeno son muy importantes en la estabilidad de los enlaces que pueden presentar estos compuestos.

6.2.2. Análisis de biodisponibilidad *in silico*: propiedades fisicoquímicas y farmacológicas

Los resultados de la página web de SWISSADME para los alcaloides quinolínicos seleccionados, diazepam y flumazenil se encuentran en la tabla 22. El radar de biodisponibilidad de estos compuestos se muestra en la Figura 29.

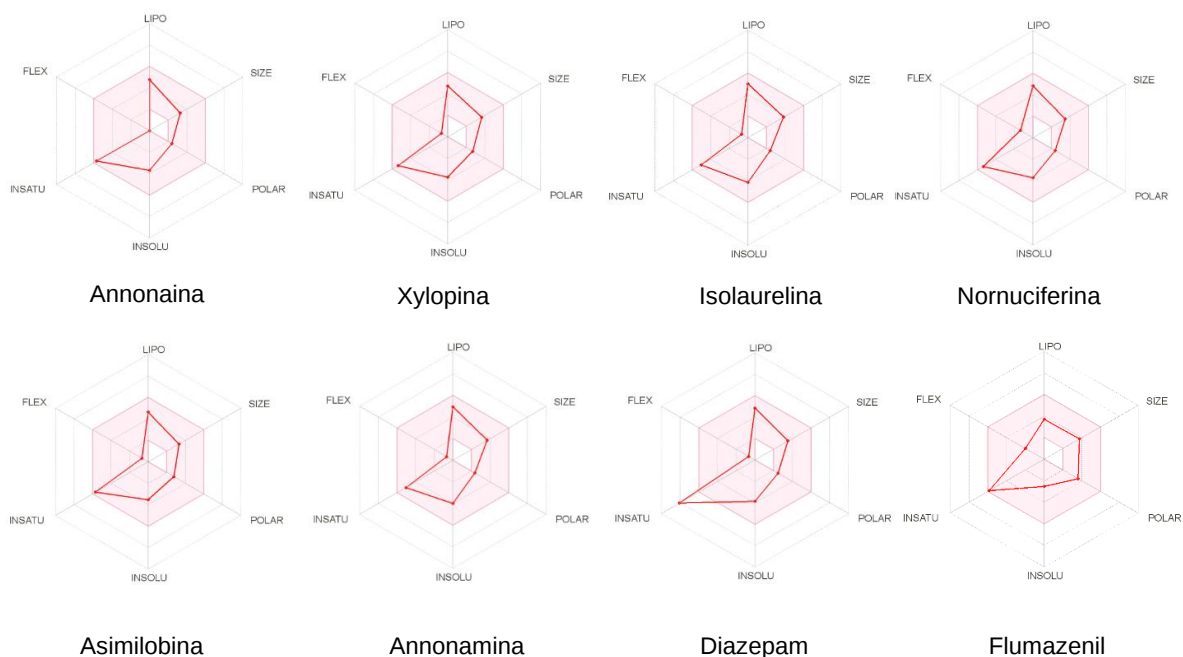


Figura 29. Radar de biodisponibilidad de alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de *A. muricata*, diazepam y flumazenil.

Tabla 22. Resultados SwissADME de alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiacepinas reportados en extractos de *A. muricata*, diazepam y flumazenil.

Descriptor	Annonaina	Xylopina	Isolaurelina	Nornuciferina	Asimilobina	Annonamina	Flumazenil	Diazepam
Formula química	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂ ⁺	C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ O ₃	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O
Peso molecular (g/mol)	265,31	295,33	309,36	281,35	267,32	296,38	303,29	284,74
Inpaturación (Fracción Csp3)	0,29	0,33	0,37	0,33	0,29	0,37	0,27	0,12
Flexibilidad (Número de enlaces rotables)	0	1	1	2	1	1	3	1
Polaridad (TPSA Å)	30,49	39,72	30,93	30,49	41,49	29,46	64,43	32,67
Log Po/w (XLO GP3)	2,83	2,8	3,27	2,96	2,64	3,12	1	2,99
Inpolubilidad (Log S ES OL)	-3,71	-3,77	-4,14	-3,74	-3,54	-3,98	-2,52	-3,87
Permeabilidad cutánea (cm/s)	-5,91	-6,11	-5,87	-5,91	-6,06	-5,89	-7,44	-5,91
Lipinkpi	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Ghose	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Veber	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Egan	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Muegge	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Puntaje de bioabilidad	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
PAINP	0	0	0	0	0	0	0	0
Brenk	0	0	0	0	0	1	0	0
Parentesco al plomo	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Accesibilidad sintética	3,36	3,5	3,61	3,35	3,24	3,5	3,06	3

Los alcaloides quinolínicos evaluados presentan un rango similar y aceptado dentro del área rosa del hexágono del radar de biodisponibilidad, incluso mejor que el diazepam, debido a que este último tiene una fracción de carbonos en hibridación sp³ inferior al ideal farmacológico (0,12). Sin embargo, flumazenil tiene un mejor radar de biodisponibilidad, ya que tiene una mejor flexibilidad (tres enlaces rotables).

Flumazenil tiene mejor flexibilidad que los otros compuestos evaluados porque tienen más enlaces rotables, sin embargo es importante saber que la rigidez molecular es más compleja que el conteo de enlaces rotativos, porque los sistemas de anillos no son rígidos como lo asume el radar de biodisponibilidad (102) y todos los alcaloides quinolínicos evaluados tienen anillos.

6.2.3. Interacciones moleculares

Las interacciones moleculares formadas en la posición con mejor energía para los alcaloides quinolínicos, flumazenil y diazepam en el sitio de unión de ECD a benzodiazepinas se analizaron utilizando tres herramientas bioinformáticas de libre acceso en LigPlot ++ y el servicio web PLIP y el sistema de visualización molecular Pymol (Fig. 30, 31 y 32; Tabla 23 y 24).

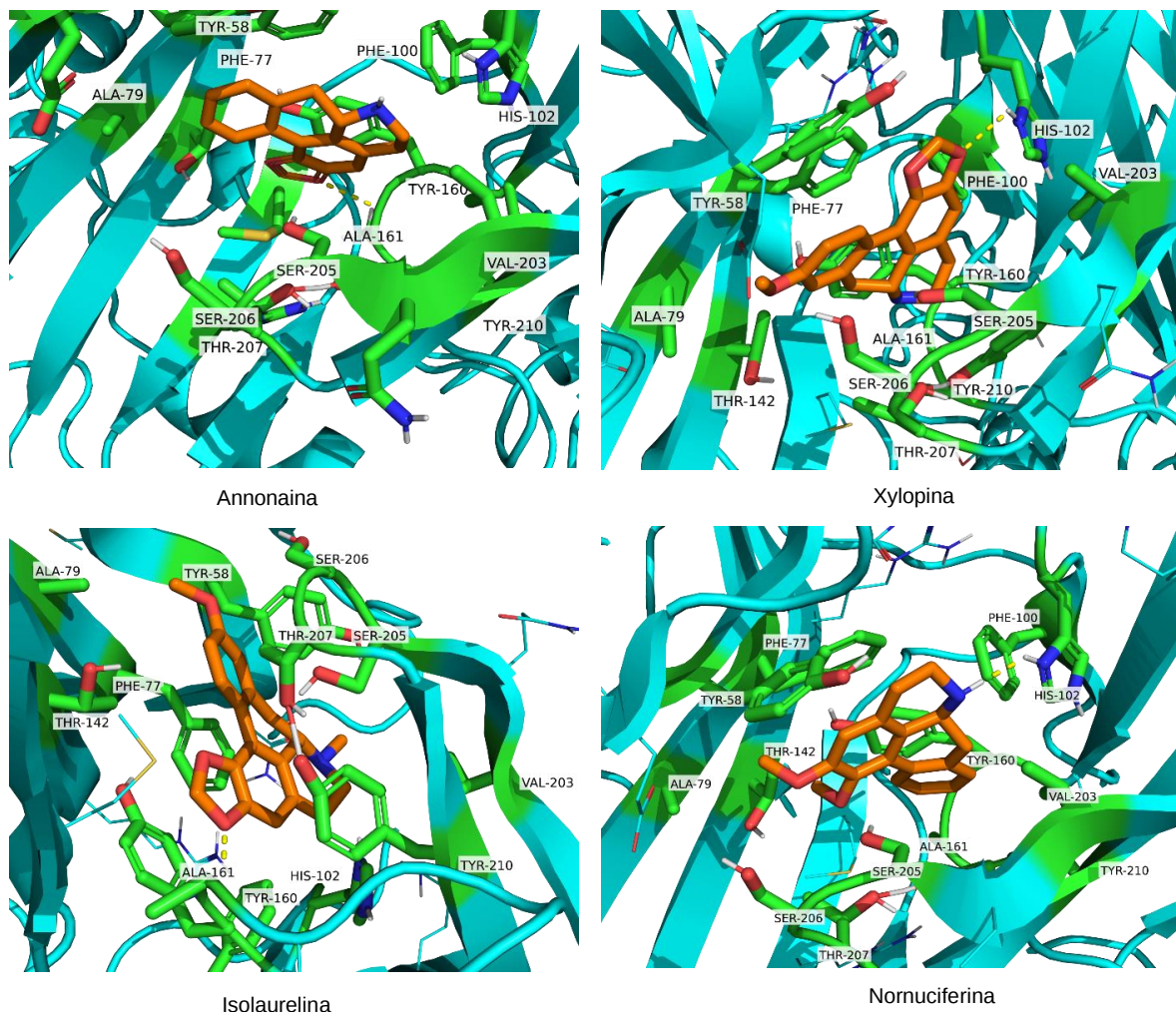


Figura 30. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de *A. muricata* visualizadas en 3D en pymol (84).

El sitio de alta afinidad a benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA-A se encuentra entre $\alpha 1$ - $\gamma 2$ (D-E) (Figura 21), las poses con mejor energía tienen más

interacciones con $\alpha 1$ en todos los compuestos evaluados, mientras que en $\gamma 2$ solo hay interacciones hidrofóbicas y de tipo π .

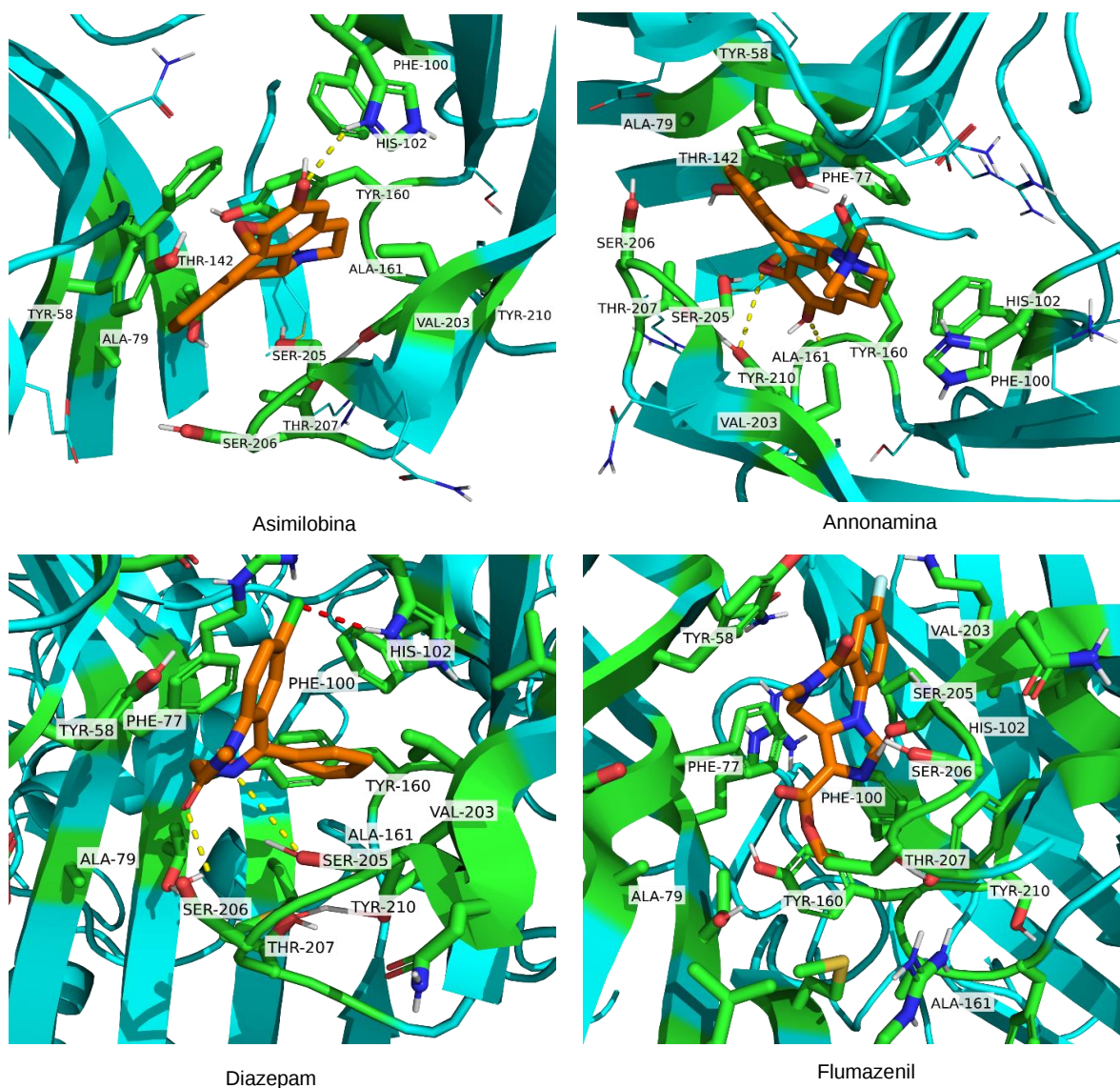


Figura 31. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de *A. muricata*, diazepam y flumazenil visualizadas en 3D en pymol (84).

Todos los alcaloides quinolínicos evaluados establecen al menos un enlace de hidrógeno en la subunidad $\alpha 1$: Xylopina, Nornuciferina y Asimilobina, se unen a His102; Annonaina, Isolaurelina y Annonamina a Ala161. Además, Annonamina también se une a Tyr210 que tiene un total de dos enlaces de hidrógeno, lo que permite deducir la estabilidad en el acoplamiento proteína-ligando (Figura 30-32). Sin embargo, la estabilidad de los complejos proteína-ligando no solo depende de

los enlaces de hidrógeno, sino que también es importante tener en cuenta interacciones tipo π , que se reconoce como importantes en el estudio farmacológico de la unión del fármaco al receptor (105).

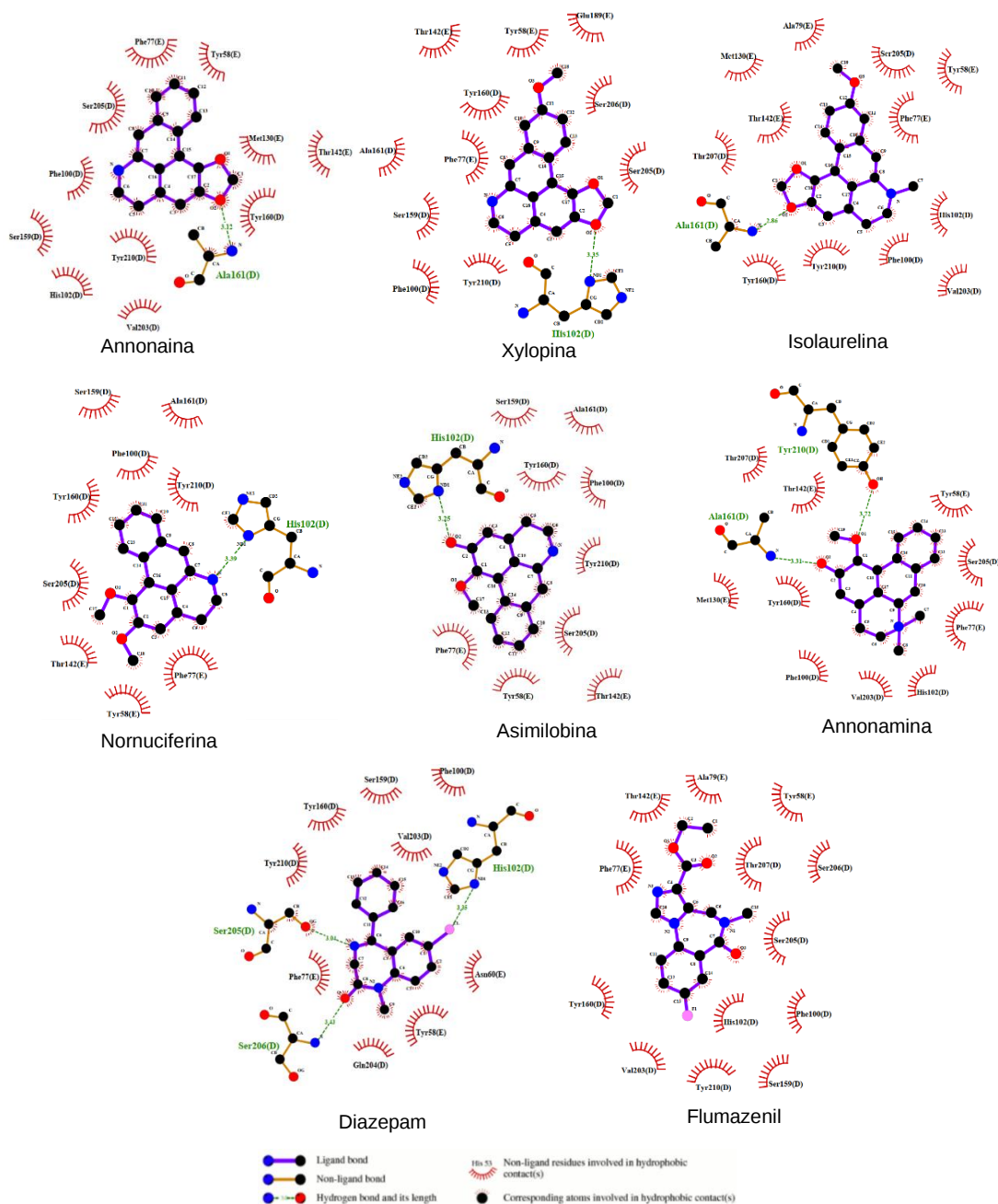


Figura 32. Interacciones moleculares de receptor GABA_A-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de *A. muricata*, diazepam y flumazenil; de acuerdo a LigPlot++ (82)

Las interacciones tipo π están presentes entre Annonaina, Isolaurelina y Nornuciferina con tirosina 160 y 210 en la subunidad $\alpha 1$ (Tabla 23), este aminoácido presenta frecuentemente interacciones de este tipo, debido a su carácter aromático, lo que le permite interactuar en este caso con los anillos de los compuestos mencionados (109).

Tabla 23. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de *A. muricata* acorde a el servicio web PLIP (83)

Interacciones	Residuo	AA	Distancia (Å)			
			Annonaina	Xylopina	Isolaurelina	Nornuciferine
Hidrofóbicas	100D	PHE	3.63	3.35, 3.60	3.74	3.69
	160D	TYR	np	3.61	3.92	np
	203D	VAL	np	np	np	np
	207D	THR	np	np	np	np
	210D	TYR	3.73	np	np	np
	58E	TYR	3.38, 3.72	3.34	np	3.37, 3.41
	77E	PHE	3.54, 3.77, 3.58	3.61, 3.65, 3.93	3.38, 3.41, 3.63	3.58
	79E	ALA	np	np	np	np
	142E	THR	np	np	3.86	np
Enlace halógeno	102D	HIS	np	np	np	np
Enlaces de hidrógeno	102D	HIS	np	3.35	np	3.39
	161D	ALA	3.12	np	1.87	np
	205D	SER	np	np	np	np
	206D	SER	np	np	np	np
	210D	TYR	np	np	np	np
Interacciones tipo Π	160D	TYR	4.34	np	4.71	4.77
	210D	TYR	4.18	np	4.27	4.27

Adicional a los enlaces de hidrógeno e interacciones tipo π , las interacciones hidrofóbicas son muy importantes para estabilizar los complejos proteína-ligando, y en este aspecto, los alcaloides quinolínicos tienen un número muy similar de interacciones hidrofóbicas con distancias menores a 4Å (entre seis y siete interacciones), a excepción de Nornuciferina, que solo tiene cuatro (Tabla 23 y 24).

El diazepam presenta dos enlaces de hidrógeno con Ser205 (3,04 Å) y Ser206 (3,43 Å), además tiene un enlace de halógeno con His102 (Figura 31 y 32 y Tabla 24), enlaces que ya han sido reportados (40,54,106,107); estas interacciones producen una unión más fuerte al locus ECD que los alcaloides quinolínicos evaluados, ya

que aunque estos compuestos presentan interacciones tipo π que hacen que su unión sea fuerte, los enlaces de hidrógeno y halógeno representan una fuerza de atracción dominante sobre interacciones como las tipo π (105)

Tabla 24. Interacciones moleculares de receptor GABAA-alcaloides quinolínicos con mejor docking score al sitio de unión ECD de las benzodiazepinas reportados en extractos de *A. muricata*, diazepam y flumazenil acorde a el servicio web PLIP (83)

Interacciones	Residuo	AA	Distancia (Å)			
			Asimilobine	Annonamine	Diazepam	Flumazenil
Hidrofóbicas	100D	PHE	3.48, 3.63	3.24	3.69	3.60
	160D	TYR	3.69	3.91	3.57	3.94
	203D	VAL	np	np	3.89	3.73
	207D	THR	np	np	np	3.79
	210D	TYR	np	np	3.80, 3.60	np
	58E	TYR	3.35	3.38	3.51	np
	77E	PHE	3.59, 3.69, 3.79	3.64, 3.91, 4.00	3.29	np
	79E	ALA	np	np	np	3.95
	142E	THR	np	3.41	np	np
Enlace halógeno	102D	HIS	np	np	3.35	np
Enlaces de hidrógeno	102D	HIS	3.25	np	np	np
	161D	ALA	np	3.31	np	np
	205D	SER	np	np	3.04	np
	206D	SER	np	np	3.43	np
	210D	TYR	np	3.72	np	np
Interacciones tipo Π	160D	TYR	np	np	np	np
	210D	TYR	np	np	np	3.80

Flumazenil tiene el enlace más débil porque no presenta enlaces de hidrógeno. Sin embargo, este compuesto tiene cuatro interacciones hidrofóbicas con Phe100, Tyr160, Val203, Thr207 en $\alpha 1$ y Ala79 en $\gamma 2$ y una interacción π con Tyr210 en $\alpha 1$ (Figura 30, 31 y Tabla 24). Su modo de unión es completamente diferente en comparación con el diazepam, ya que mientras el diazepam adopta una estructura más tridimensional en solución, el flumazenil es más plano similar a los alcaloides de las quinolinas (40,54,106,107).

Las interacciones proteína-ligando explican la alta afinidad presente entre Annonaina por el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas (ECD) en el receptor GABA_A según el docking score (-12,0 Kcal/mol), ya que este compuesto presenta un enlace de hidrógeno con Ala161 (3,12 Å), dos interacciones π con Tyr160 y Tyr210 y siete interacciones hidrofóbicas con Phe100, Tyr210 ($\alpha 1$), Tyr58 y Phe77 ($\gamma 2$) (Figura 30, 31 y Tabla 23), estas últimas también están en Diazepam como lo

reportó Kim & Hibbs (2021) (40). Además, el complejo GABA_A-Annonaina se analizó en Pymol para evaluar las interacciones electrostáticas de unión tomando una distancia-vdw menor < 0.89 sin encontrar repulsiones estéricas entre el complejo proteína-ligando. Lo anterior es importante ya que se ha reportado que los efectos estéricos en la unión proteína-ligando pueden tener diferentes consecuencias en la respuesta molecular, por ejemplo pueden producir cambios en la cinética de la interacción (110). De acuerdo a esto, el complejo GABA_A-Annonaina es muy estable y las características de este ligando como: alta absorción gastrointestinal, cruzar la barrera hematoencefálica y sus reportes de acción en sistema nervioso central (37), lo hacen una molécula interesante para la evaluación de su estabilidad a través del tiempo, la cual fue evaluada por dinámica molecular, comparándola con Diazepam y Flumazenil.

6.2.4. Dinámica molecular

Para estudiar la estabilidad de Annonaina, Flumazenil y Diazepam en GABA_A, los complejos proteína-ligando y el receptor GABA_A sólo, fueron seguidos en el tiempo a través de simulaciones dinámicas y cálculo de RMSD y Rgyr. El RMSD mide la diferencia entre el esqueleto de la proteína desde la conformación de una estructura inicial hasta la posición final, encontrando altas fluctuaciones de RMSD cuando la proteína es inestable (44). De acuerdo con lo anterior, el complejo GABA_A-Annonaine y GABA_A-Flumazenil presenta enlaces más estables a lo largo de las 30.000 ps evaluadas en comparación con el complejo GABA_A-diazepam. Sin embargo, al comparar los complejos evaluados con la proteína sin ligando se encontró gran similitud en el comportamiento de la RMSD de esta última con el complejo GABA_A-diazepam (Figura 33).

El radio de giro de los complejos GABA_A-Diazepam y GABA_A-Flumazenil; y GABA_A sólo fluctúan de manera similar entre 4,37 a 4,41 nm, estabilizándose en alrededor de 50ps, por el contrario, el complejo GABA_A-Annonaine presenta mayores fluctuaciones, presentando la mayor parte del tiempo un Rgyr entre 4.39 y 4.41nm. Sin embargo, el último complejo mencionado presentó Rgyr mayores entre 3000 - 4000ps, 9000-11000ps, 22000-25000ps, con una disminución y comportamiento similar al complejo GABA_A-Diazepam y GABA_A solo, después de 2800ps (Figura 34). Estas fluctuaciones mayores en el complejo GABA_A-Annonaine pueden estar relacionadas con la carga del ligando (+1), lo que genera una diferencia en el campo eléctrico del complejo en comparación con GABA_A solo y los otros dos complejos (carga 0). Estas fluctuaciones más grandes en Rgyr se han relacionado con un aumento en el campo eléctrico (111).

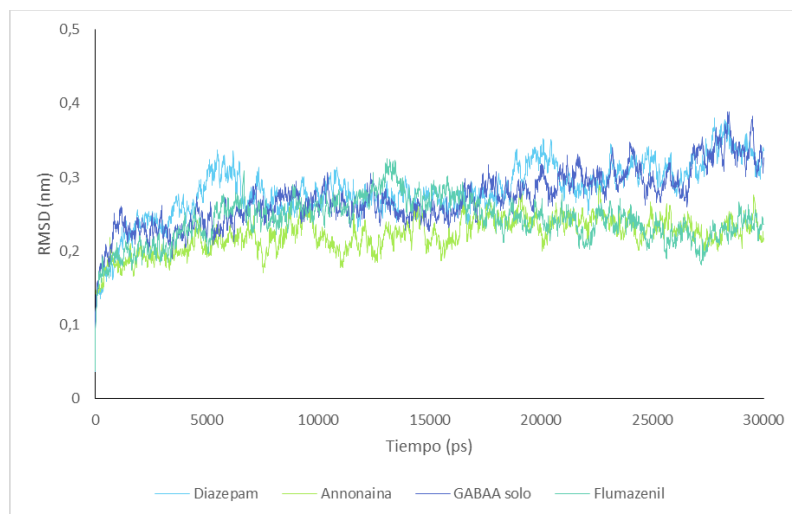


Figura 33. RMSD obtenido de la simulación de dinámica molecular del receptor de GABA_A sólo y en complejo con Annonaina, Diazepam y Flumazenil.

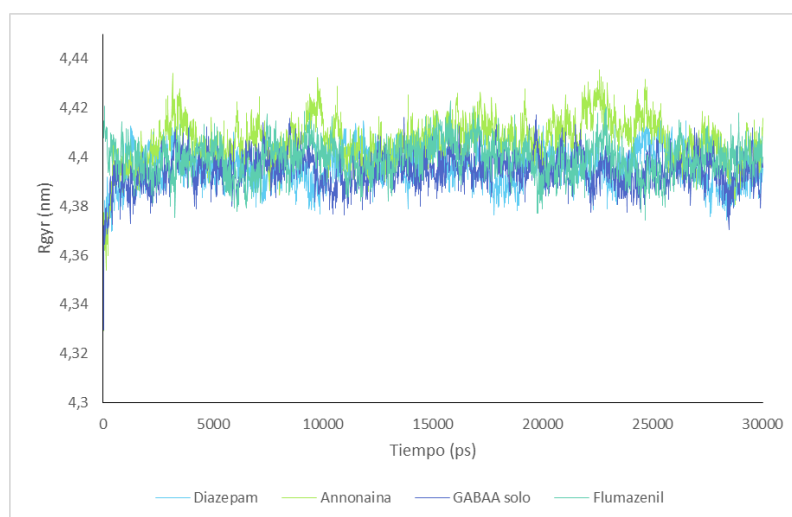


Figura 34. Rgyr obtenido de la simulación de dinámica molecular del receptor de GABA_A sólo y en complejo con Annonaina, Diazepam y Flumazenil.

6.3. CONCLUSIÓN

La propuesta de nuevos ligandos que encajen de manera complementaria a un bolsillo de unión específico es uno de los factores a considerar al momento de evaluar posibles moléculas con fines terapéuticos, es un desafío garantizar que las moléculas propuestas adopten conformaciones similares de baja energía tanto en su interior como fuera del bolsillo de unión (112), propiedades que tiene Annonaina, ya que su baja flexibilidad le otorga mayor estabilidad. De acuerdo con esto, la revisión del puntaje de acoplamiento molecular, las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, las interacciones moleculares similares tanto a diazepam como a flumazenil y su alta estabilidad permiten establecer a Annonaina como un alcaloide con una posible acción farmacológica sobre el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A, prediciendo *in silico* una nueva acción posible de este compuesto sobre el sistema nervioso central.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Los tratamientos para la Epilepsia buscan disminuir la presentación de crisis y de esta manera mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad. Para ello se han desarrollado diversos modelos animales que permiten simular las crisis epilépticas, en este estudio se empleó el modelo de estatus epiléptico por PILO, y aunque este sólo fue evaluado de manera aguda, los resultados obtenidos permiten pensar en la posibilidad de una acción anticonvulsiva que pueda extenderse a pacientes con epilepsia refractaria debido a la variación demostrada de la respuesta de los animales ante medicamentos como el fenobarbital (76) y en el caso de este estudio al tratamiento con extracto de *A. muricata*.

La evaluación *in vivo* del efecto anticrisis de *A. muricata* permitió establecer un posible efecto en la dosis de 250 mg/Kg de extracto metanólico entero de sus hojas sobre ratas macho Wistar, este efecto había sido probado en ratones Swiss machos donde se encontró una reducción de la presencia de crisis tónicas ante la inyección de PTZ después de una hora de la inyección del extracto, en dosis de 5, 50, 100 y 300 mg/Kg, con una tendencia a un menor número de crisis con el aumento de la dosis (32). Adicionalmente, en extractos acuosos con dosis de 12, 30, 60 y 120 mg/Kg también en ratones Swiss machos se encontró un efecto anticonvulsivo con el aumento de dosis al ser probado previo a la inyección de estricnina, PTZ o NMDA una hora después a la inyección intraperitoneal de la dosis (16).

Algo interesante es que, a pesar de verse una tendencia a un aumento del efecto anticrisis con el aumento de dosis evaluadas en estudios previos, los resultados de este estudio muestran con el aumento de la dosis un comportamiento electroencefalográfico y neuroprotector similar entre los animales tratados con las dosis de 500 y 1000 mg/Kg de extracto entero metanólico *A. muricata* con los tratados con vehículo. Lo anterior puede relacionarse con un aumento de la toxicidad del extracto con el aumento de dosis tal como lo encontrado por N'Gouemo et al. (1997), donde se encontraron cambios en el comportamiento explorativo y constricciones abdominales en el 20% y 60% de ratones Swiss tratados con 300 y 1000 mg/Kg respectivamente de extracto etanólico entero (32).

Los posibles efectos tóxicos de las dosis altas pueden relacionarse con la gran diversidad de compuestos químicos presentes en un extracto entero, que, si bien pueden incluir compuestos con efectos anticrisis, también pueden tener otros que

disminuyan su efecto y su potencial farmacológico con el aumento de las dosis, incluso es posible mejor efecto anticrisis de compuestos aislados que de extractos enteros, como lo reportó González-Trujano et al. (2006) donde se encontró un efecto anticrisis sobre ratas Wistar machos inyectadas con Penicilina G (convulsivante) de la palmitona aislada de *A. diversifolia* más no de los extractos en etanol y hexano realizados de la misma (10).

A partir de los resultados obtenidos en análisis *in vivo* y lo encontrado en la literatura, fue importante conocer la composición química del extracto empleado, logrando encontrar 11 posibles compuestos. Para lograr la evaluación de un posible efecto anticrisis estos fueron evaluados *in silico* a través de herramientas web como SwissADME y PLIP; y computacionales como acoplamiento y dinámica molecular, con el fin de conocer su posible interacción con el sitio de unión de alta afinidad de las benzodiazepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A, esto debido a la respuesta neuroprotectora del extracto (un aumento de la densidad de células PV+ con la dosis de 250 mg/Kg), que permite asociar la acción farmacológica a neuronas GABAérgicas. A partir de esta evaluación se encontró el compuesto n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida, con una alta posibilidad farmacológica debido a la presencia de características similares a fármacos según su radar de biodisponibilidad; interacciones como dos enlaces de hidrógeno, una interacción π y 11 interacciones hidrofóbicas; y una unión estable del complejo GABA_A-n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida a través del tiempo según la simulación de dinámica molecular. Sin embargo, este compuesto no cuenta con reportes de ningún efecto biológico que permita establecer las relaciones de este.

El análisis de la composición química del extracto entero además arrojó la presencia de muchos picos de compuestos que no fueron identificados por las bases de datos empleadas en este estudio, los cuáles pueden tratarse de compuestos nuevos o no elucidados, resultado similar al análisis de extracto etanólico realizado por Gavamukulya et al. (2015) quienes encontraron 11 compuestos sin identificación tras el empleo de GC-MS (89): Una de las razones para la no elucidación de gran parte de los compuestos presentes en el extracto entero es su heterogeneidad, lo que conllevó a pensar en la necesidad ampliar la información respecto a los posibles compuestos presentes en *A. muricata* que explicaran su acción anticonvulsiva.

Teniendo en cuenta el análisis anterior, se realizó una búsqueda en las bases de datos biomédicas de los compuestos encontrados en *A. muricata*, encontrando 115 compuestos de los cuáles 8 presentaron mejor energía de unión que el diazepam al recepto GABA_A en el sitio de unión extracelular de las benzodiazepinas, de los

cuales 6 correspondieron a alcaloides derivados de las quinolonas y fueron analizados, encontrando interacciones similares entre sí y con el diazepam con GABA_A, logrando establecer una alta posibilidad de interacción de estos con este sitio de unión. Entre los alcaloides quinolínicos con alta energía de acoplamiento se presentan la asimilobina, nornuciferina y annonaina que ya se habían reportado con efectos sobre el sistema nervioso específicamente sobre el receptor 5-HT_{1A} (17,36). Este último debido a su alta de energía de acoplamiento e interacciones fuertes con el sitio de unión evaluado, fue analizado a través de simulación de dinámica molecular encontrando una unión de complejo GABA_A-Annonaine más estable a lo largo del tiempo versus GABA_A-Diazepam y GABA_A-Flumazenil.

8. CONCLUSIONES GENERALES

La dosis de 250 mg/Kg de extracto entero metanólico de *A. muricata* genera un efecto anticrisis y neuroprotector sobre el modelo de estatus epiléptico por pilocarpina en ratas wistar machos.

La diversidad de compuestos del extracto entero metanólico de *A. muricata* afecta su identificación por GC-MS y por tanto la posible relación de estos mismos con su efecto anticrisis.

Los compuestos n-(2-(1-metilciclopropil)fenil)-4-clorobenzamida presente en el extracto entero metanólico y annonaina presente en los reportes de *A. muricata*, presentan características farmacológicas, de acople, y dinámica molecular evaluados *in silico* interesantes sobre el sitio de alta afinidad de las benzodiazepinas en el dominio extracelular del receptor GABA_A, permitiendo establecerlos como potenciales fármacos con acción GABAérgica y por tanto anticonvulsivante.

9. RECOMENDACIONES

Los resultados de este estudio permiten continuar con el planteamiento de una acción anticrisis de *A. muricata*. Sin embargo, es importante tener cuenta que responden a la evaluación en un modelo de estatus epilépticos que no emula a la epilepsia refractaria y que adicionalmente sólo evalúa el efecto agudo anticrisis, por lo que es necesario la ampliación de registro en el tiempo tanto comportamental como electroencefalográfico.

La evaluación de neuroprotección a través del análisis de neuronas PV+ permite abrir una puerta hacia el conocimiento de una mayor densidad poblacional de esta neuronas ante dosis de extracto que no producen toxicidad, sin embargo, deja como recomendación la ampliación de esta evaluación con el empleo de otros marcadores como la evaluación de células piramidales y glía y su afectación con las crisis producidas por PILO y cómo éstas pueden conservar su citoarquitectura con el uso de las dosis adecuadas de *A. muricata*.

Adicionalmente el efecto anticrisis deja de ser importante con el aumento de la concentración de dosis de extracto entero que se inyecta en los biomodelos, sugiriendo que los compuestos activos con posible efecto anticonvulsivante pueden quedar en concentraciones muy bajas respecto a otros de carácter tóxico que pueden generar un efecto diferente al esperado. Por lo que es necesario realizar pruebas con compuestos aislados con posible acción anticonvulsivante como los aquí reportados por evaluación *in silico* sobre el receptor GABA_A.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Beghi E, Giussani G. Aging and the Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2018;216–23.
2. Minjarez B, Camarena HO, Haramati J, Rodríguez-Yañez Y, Mena-Munguía S, Buriticá J, et al. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2017;83(November 2016):373–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.016>
3. Burneo JG, Tellez-Zenteno J, Wiebe S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Res*. 2005;66(1–3):63–74.
4. Pradilla A. G, Vesga A. BE, León-Sarmiento FE. Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev Panam Salud Pública* [Internet]. 2003;14(2):104–11. Available from: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892003000700005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
5. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). 2016;46(4):20161024.
6. Ekstein D, Schachter SC. Natural products in epilepsy-the present situation and perspectives for the future. *Pharmaceuticals*. 2010;3(5):1426–45.
7. Falcicchia C, Simonato M, Verlengia G. New Tools for Epilepsy Therapy. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2018;12(May):1–7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2018.00147/full>
8. Mula M. Investigational new drugs for focal epilepsy. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2016;25(1):1–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2016.1110144>
9. Sriranjini SJ, Sandhya K, Mamta VS. Ayurveda and botanical drugs for epilepsy: Current evidence and future prospects. *Epilepsy Behav* [Internet]. 2015;52:290–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.039>
10. González-Trujano ME, Tapia E, López-Meraz L, Navarrete A, Reyes-Ramírez A, Martínez A. Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*. 2006;47(11):1810–7.
11. Sucher NJ, Carles MC. A pharmacological basis of herbal medicines for

- epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2015;52:308–18.
12. Mannino G, Gentile C, Porcu A, Agliassa C, Caradonna F, Berteà CM. Chemical profile and biological activity of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and atemoya (*Annona atemoya*) leaves. *Molecules.* 2020;25(11).
 13. Kakooza-Mwesige A. The importance of botanical treatments in traditional societies and challenges in developing countries. *Epilepsy Behav.* 2015;52:297–307.
 14. Quílez AM, Fernández-Arche MA, García-Giménez MD, De la Puerta R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;225:244–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.014>
 15. Satia Nugraha A, Dian Damayanti Y, Wangchuk P, Keller PA. Anti-Infective and Anti-Cancer Properties of the *Annona* Species: Their Ethnomedicinal Uses, Alkaloid Diversity, and Pharmacological Activities. *Molecules.* 2019;24(4419):1–31.
 16. Ngo E, Taiwe GS, Moto FCO, Ngoupaye GT, Vougat RRN, Sakoue VD, et al. Antiepileptic Medicinal Plants used in Traditional Medicine to Treat Epilepsy. *Clin Genet Asp Epilepsy.* 2011;(May 2014).
 17. Hasrat JA, Peters L, De Backer JP, Vauquelin G, Vlietinck AJ. Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1A} ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine.* 1997;4(2):133–40.
 18. Rabiei Z. Anticonvulsant effects of medicinal plants with emphasis on mechanisms of action. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2017;7(2):166–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.028>
 19. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and epilepsy: An overview. *Epilepsy Intersect Neurosci Biol Math Eng Phys.* 2016;65–77.
 20. Leite J, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro E. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* [Internet]. 2002;50(1–2):93–103. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002288054>
 21. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008;172(2):143–57.
 22. De Furtado MA, Braga GK, Oliveira JAC, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia.* 2002;43(SUPPL. 5):37–9.

23. DeFelipe J, Hendry SHC, Jones EG. Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(6):2093–7.
24. Pallas SL. Developmental plasticity of inhibitory circuitry. *Dev Plast Inhib Circuitry*. 2010;2:1–190.
25. Freundl TF. Hippocampus 1996 Freund.pdf. 1996;470.
26. Booker SA, Vida I. Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res*. 2018;373(3):619–41.
27. Winsky L, Kuźnicki J. Antibody Recognition of Calcium-Binding Proteins Depends on Their Calcium-Binding Status. *J Neurochem*. 1996;66(2):764–71.
28. Siegle JH, Hale GJ, Newman JP, Voigts J. Neural ensemble communities: Open-source approaches to hardware for large-scale electrophysiology. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2015;32:53–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2014.11.004>
29. Medlej Y, Asdikian R, Wadi L, Salah H, Dosh L, Hashash R, et al. Enhanced setup for wired continuous long-term EEG monitoring in juvenile and adult rats: application for epilepsy and other disorders. *BMC Neurosci* [Internet]. 2019;20(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0490-z>
30. Cambiaghi M, Magri L, Cursi M. Importance of EEG in validating the chronic effects of drugs : Suggestions from animal models of epilepsy treated with rapamycin. *Seizure Eur J Epilepsy* [Internet]. 2015;27:30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2015.02.015>
31. Ioannis P, Anastasis S, Andreas Y. Graviola: A Systematic Review on Its Anticancer Properties. *Am J Cancer Prev Vol 3*, 2016, Pages 128-131. 2016;3(6):128–31.
32. N’Gouemo P, Koudogbo B, Pambou Tchivounda H, Akono-Nguema C, Etoua MM. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phyther Res*. 1997;11(3):243–5.
33. Albuquerque TG, Santos F, Sanches-Silva A, Beatriz Oliveira M, Bento AC, Costa HS. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chem*. 2016;193:187–95.
34. Okoye TC, Akah PA, Omeje EO, Okoye FBC, Nworu CS. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2013;109:38–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.05.001>

35. Mohamad Rosdi MN, Nik Mat Daud NNN, Zulkifli RM, Ya'akob H. Cytotoxic effect of *Annona muricata* Linn leaves extract on Capan-1 cells. *J Appl Pharm Sci*. 2015;5(5):45–8.
36. Hasrat JA, De Bruyne T, De Backer JP, Vauquelin G, Vlietinck AJ. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: Unexploited antidepressive (lad) products. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49(11):1145–9.
37. Li HT, Wu HM, Chen HL, Liu CM, Chen CY. The pharmacological activities of (-)-anonnaine. *Molecules*. 2013;18(7):8257–63.
38. Roslida AH, Chan PF, Zuraini A, Hussain MK. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *annona muricata* leaf. *Brazilian J Pharmacogn*. 2012;22(3):630–41.
39. Roslida AH, Tay CE, Zuraini A, Chan PF. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *J Nat Remedies*. 2010;10(2):97–104.
40. Kim JJ, Hibbs RE. Direct Structural Insights into GABA_A Receptor Pharmacology. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2021;46(6):502–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.011>
41. Calcatterra NE, Barrow JC. Classics in chemical neuroscience: Diazepam (valium). *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(4):253–60.
42. Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL. GABA_A Receptor Trafficking-Mediated Plasticity of Inhibitory Synapses. *Neuron* [Internet]. 2011;70(3):385–409. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.024>
43. Crampon K, Giorkallos A, Deldossi M, Baud S, Steffenel LA. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. *Drug Discov Today*. 2022;27(1):151–64.
44. Mejia-Gutierrez M, Vásquez-Paz BD, Fierro L, Maza JR. In Silico Repositioning of Dopamine Modulators with Possible Application to Schizophrenia: Pharmacophore Mapping, Molecular Docking and Molecular Dynamics Analysis. *ACS Omega*. 2021;6(23):14748–64.
45. Crampon K, Giorkallos A, Deldossi M, Baud S, Steffenel LA. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. Vol. 27, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2022. p. 151–64.
46. Muegge I, Rarey M. Small molecule docking and scoring. Vol. 17, *Reviews in Computational Chemistry*. 2001. 1–60 p.
47. Karplus M, McCammon A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol*. 2002;9(9):646–52.

48. Sneha P, Doss CGP. Molecular Dynamics : New Frontier in Personalized Medicine [Internet]. 1st ed. Personalized medicine. Elsevier Inc.; 2015. 1–44 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.09.004>
49. Dien H, Deane CM, Knapp B. Gro2mat: A package to efficiently read gromacs output in MATLAB. *J Comput Chem*. 2014;35(20):1528–31.
50. Dodson GG, Lane DP, Verma CS. Molecular simulations of protein dynamics: New windows on mechanisms in biology. *EMBO Rep*. 2008;9(2):144–50.
51. Aqvist J, Luzhkov VB, Brandsdal BO. Ligand binding affinities from MD simulations. *Acc Chem Res*. 2002;35(6):358–65.
52. Guvench O, Mackerell AD. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. *Methods Mol Biol*. 2008;443:63–88.
53. Coria-Téllez A V., Montalvo-González E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arab J Chem*. 2018;11(5):662–91.
54. Masiulis S, Desai R, Uchański T, Serna Martin I, Laverty D, Karia D, et al. GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*. 2019;565(7740):454–9.
55. Chang YY, Gong XW, Gong HQ, Liang PJ, Zhang PM, Lu QC. GABAAR Activity Suppresses the Transition from Inter-ictal to Ictal Epileptiform Discharges in Juvenile Mouse Hippocampus. *Neurosci Bull* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0273-z>
56. Sahila M, Babitha PP, Bandaru S, Nayarisseri A, Doss VA. Molecular docking based screening of GABA (A) receptor inhibitors from plant derivatives. *Bioinformation*. 2015;11(6):280–9.
57. Alvarez LD, Pecci A. Structure and dynamics of neurosteroid binding to the $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2018;182(March):72–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.012>
58. OECD. OECD/OCDE 423. OECD guideline for testing of chemicals acute oral toxicity. 2001;(December):1–14. Available from: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf
59. Sócrates, Victoria L, Fernández O, Bonelo A, Perlaza BL, Zapata C, et al. Colombia médica. [Internet]. Vol. 36, Colombia Médica. Universidad del Valle; 2005 [cited 2019 Feb 26]. 5–15 p. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342005000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es

60. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: Modification of after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:281–94.
61. Mathiasen JR, Moser VC. The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents. *Curr Protoc Pharmacol*. 2018;83(1):1–18.
62. Motulsky H. GraphPad [Internet]. San Diego, California USA; 2019. Available from: www.graphpad.com
63. Ramsay JO, Silverman BW. Functional Data Analysis [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2005. (Springer Series in Statistics). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/b98888>
64. Giraldo R, Molina A, Torres J, Acosta M, Martínez S. Estudio de firmas espectrales de palmas de aceite afectadas con la Marchitez letal, usando análisis estadísticos de datos funcionales. 2016;37:131–9.
65. Gastwirth JL, Gel YR, Miao W. The Impact of Levene's Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice. *Stat Sci*. 2009;24(3):343–60.
66. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc*. 1952;47(260):583–621.
67. Hinkelmann K, Hinkelmann K, Kempthorne O. Design and Analysis of Experiments, Introduction to Experimental Design [Internet]. Wiley; 1994. (A Wiley-Interscience publication). Available from: <https://books.google.com.co/books?id=0CPXYBz61H4C>
68. Sachs L. Angewandte Statistik [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-05750-6>
69. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021. Available from: <https://www.r-project.org/>
70. Castro OW, Furtado MA, Tilelli CQ, Fernandes A, Pajolla GP, Garcia-Cairasco N. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res* [Internet]. 2011;1374:43–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.012>
71. Jones MW, Wilson MA. Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biol*. 2005;3(12):1–13.
72. Forcelli PA, Orefice LL, Heinrichs SC. Neural, endocrine and

- electroencephalographic hyperreactivity to human contact: A diathesis-stress model of seizure susceptibility in El mice. *Brain Res.* 2007;1144(1):248–56.
73. Kršek P, Mikulecká A, Druga R, Kubová H, Hlíňák Z, Suchomelová L, et al. Long-term behavioral and morphological consequences of nonconvulsive status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav.* 2004;5(2):180–91.
 74. Da Silva AV, Regondi MC, Cavalheiro EA, Spreafico R. Disruption of cortical development as a consequence of repetitive pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia.* 2005;46(SUPPL. 5):22–30.
 75. Da Silva AV, Regondi MC, Cipelletti B, Frassoni C, Abrão Cavalheiro E, Spreafico R. Neocortical and hippocampal changes after multiple pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia.* 2005;46(5):636–42.
 76. Bankstahl M, Bankstahl JP, Löscher W. Inter-individual variation in the anticonvulsant effect of phenobarbital in the pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* [Internet]. 2012;234(1):70–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.014>
 77. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
 78. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785–91.
 79. Frisch MJ, Trucks G, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman J, et al. Gaussian 09 Revision A.1. Gaussian Inc. 2009 Jan 1;
 80. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An Open chemical toolbox. *J Cheminform* [Internet]. 2011;3(10):33. Available from: <http://www.jcheminf.com/content/3/1/33>
 81. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2009;31(2):NA-NA.
 82. Laskowski RA, Swindells MB. Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model.* 2011;
 83. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W443–7.
 84. Schödlinger L, DeLano W. Pymol [Internet]. 2020. Available from: <http://www.pymol.org/pymol>

85. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun.* 1995;91(1–3):43–56.
86. Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput.* 2008;4(3):435–47.
87. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1701–18.
88. Pillai G. Jupyter Notebooks for Molecular Dynamics [Internet]. GitHub repository. 2021. Available from: <https://github.com/giribio/MDNotebooks>
89. Gavamukulya Y, Abou-Elella F, Wamunyokoli F, El-Shemy HA. GC-MS analysis of bioactive phytochemicals present in ethanolic extracts of leaves of *annona muricata*: A further evidence for its medicinal diversity. *Pharmacogn J.* 2015;7(5):300–4.
90. Yirankinyuki FF, Magaji B, Danbature WL, Abdullah AM. Identification of Active Compounds of *Annona muricata* (Soursop) Leaf Wax Extract Using GC-MS. *Arch Curr Res Int.* 2020;(June):17–21.
91. Murru E, Manca C, Carta G, Banni S. Impact of Dietary Palmitic Acid on Lipid Metabolism. *Front Nutr.* 2022;9(March):1–9.
92. Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Borah R, Sharma B, Pandhi S, et al. Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of *Cannabis sativa* L.: An overview. *Phyther Res.* 2021;35(11):6010–29.
93. Senn L, Cannazza G, Biagini G. Receptors and channels possibly mediating the effects of phytocannabinoids on seizures and epilepsy. *Pharmaceuticals.* 2020;13(8):1–22.
94. Breijyeh Z, Jubeh B, Bufo SA, Karaman R, Scrano L. Cannabis: A Toxin-Producing Plant with Potential Therapeutic Uses. *Toxins (Basel).* 2021;13(2):1–2.
95. Čechovská L, Cejpek K, Konečný M, Velíšek J. On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. Vol. 233, *European Food Research and Technology.* 2011. p. 367–76.
96. Information NC for B. PubChem Compound Summary for CID 2682, 1-Hexadecanol. [Internet]. Retrieved May 27, 2022. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Hexadecanol>
97. Roy S, Rao K, Bhuvaneswari C, Giri A, Mangamoori LN. Phytochemical analysis of *Andrographis paniculata* extract and its antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26(1):85–91.

98. Yogeswari S, Ramalakshmi S, Neelavathy R, Muthu, ary J. Identification and Comparative Studies of Different Volatile Fractions from *Monochaetia kansensis* by GCMS. *Glob J Pharmacol*. 2012;6(2):65–71.
99. Adeosun CB, Olaseinde S, Opeifa AO, Atolani O. Essential oil from the stem bark of *Cordia sebestena* scavenges free radicals. *J Acute Med* [Internet]. 2013;3(4):138–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacme.2013.07.002>
100. Adesanwo JK, Akinloye AA, Otemuyiwa IO, Akinpelu DA. Chemical Characteristics and Biological Activities of *Annona squamosa* Fruit Pod and Seed Extracts. *J Explor Res Pharmacol*. 2020;000(000):000–000.
101. Mejía-Gutiérrez M, Olivero-Verbel J, Quiroga J, Romo P, Castaño S, Fierro L. Prediction of the potential biological activity of novel spiropyrazolo[3,4-b]pyridines and spiropyrazolo[3,4-b]pyridine-5,5'-pyrimidines by a ligand–protein inverse-docking approach. *J Mol Graph Model*. 2020;97.
102. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*. 2002;45(12):2615–23.
103. Breiten B, Lockett MR, Sherman W, Fujita S, Al-Sayah M, Lange H, et al. Water networks contribute to enthalpy/entropy compensation in protein–ligand binding. *J Am Chem Soc*. 2013;135(41):15579–84.
104. Lebedev AT, Dianova I V., Mochalov SS, Lobodin V V., Samguina TY, Gazzaeva RA, et al. Cyclization of ortho-cyclopropylphenyl benzamides in gas and liquid phases. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001;12(8):956–63.
105. Gospodinova N, Tomšík E. Hydrogen-bonding versus π - π stacking in the design of organic semiconductors: From dyes to oligomers. *Prog Polym Sci*. 2015;43:33–47.
106. Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature*. 2018;559(7712):67–88.
107. Kim JJ, Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, Howard RJ, Zhu S, et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature* [Internet]. 2020;585(7824):303–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2654-5>
108. Verma AK, Majid A, Hossain MS, Ahmed SF, Ashid M, Bhojiya AA, et al. Identification of 1, 2, 4-Triazine and Its Derivatives Against Lanosterol 14-Demethylase (CYP51) Property of *Candida albicans*: Influence on the Development of New Antifungal Therapeutic Strategies. *Front Med Technol*. 2022;4(March).
109. Lucas X, Bauzá A, Frontera A, Quiñonero D. A thorough anion- π interaction

study in biomolecules: On the importance of cooperativity effects. *Chem Sci*. 2016;7(2):1038–50.

110. Hlavacek WS, Posner RG, Perelson AS. Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: Exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors. *Biophys J* [Internet]. 1999;76(6):3031–43. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77456-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77456-4)
111. Jiang Z, You L, Dou W, Sun T, Xu P. Effects of an Electric Field on the Conformational Transition of the Protein : A Molecular Dynamics Simulation Study. 2019;1–13.
112. Zheng Y, Tice CM, Singh SB. Conformational control in structure-based drug design. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2017;27(13):2825–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.079>

11. ANEXOS

11.1. ANEXO 1. Protocolo de inmunohistoquímica para parvalbúmina

MONOCLONAL ANTI-PARVALBUMIN (CLONE PARV-19)

MOUSE ASCITES FLUID. SIGMA No. P 3088

Preparaciones para Free Floating (2 – 3 cortes por pozo, 3 pozos)

- Buffer Phosphate Saline (PBS) 100 mM (1 litro), pH 7.4
 - 2.87 gr Fosfato de Sodio Monobásico – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 - 11.24 gr Fosfato de Sodio Bibásico – Na_2HPO_4
 - 0.84 gr Cloruro de Sodio – NaCl
- Solución de lavado (SDL) (1 litro), pH 7.4
 - 100 ml PBS 100 mM
 - 900 ml dH_2O
- Peróxido de Hidrógeno al 0.3% + Metanol al 30% (100 ml): PH+M
 - 7 ml dH_2O
 - 3 ml Metanol
 - 90 μl Peróxido de Hidrógeno – H_2O_2
- Solución para anticuerpos (SPA), 1%
 - 30 ml PBS 100 mM
 - 0.3 g Bovine Serum Albumin (BSA)
 - 150 μl Tritón X-100

- Suero de Bloqueo
- 9 ml SPA

- Anticuerpo primario (1:5000)*
- 10 ml SPA
- 2 µl Mouse Anti-PV (Sigma)

- Anticuerpo secundario (1:200)
- 30 µl Goat Anti-Mouse Biotinilado
- 6 ml SPA

- Avidina (1:50) (kit ABC Vectastain) preparar 40 min antes
- 2 gotas A
- 2 gotas B
- 5 ml SPA

- DAB (proteger de la luz) (kit Substrate Peroxidase Vector)
- 7.5 ml dH₂O
- 3 gotas buffer PB
- 6 gotas DAB
- 3 gotas H₂O₂
- 3 gotas Níquel

*Centrifugar la dilución del anticuerpo primario antes de aplicar para disolver completamente

Procedimiento

1. Agregar SDL, 3 veces x 5 min c/u (agitación permanente a temperatura ambiente: APATA)
2. Agregar PH+M, 12 min (APATA)
3. Agregar SDL, 3 veces x 5 min c/u (APATA)
4. Agregar Solución de bloqueo, 1 hr (APATA)
5. Agregar SDL, 1 vez x 5 min (APATA)
6. Agregar anticuerpo primario, 18 hr (agitación permanente a 4° C)
7. Agregar SDL, 3 veces x 5 min c/u (APATA)
8. Agregar anticuerpo secundario-biotinilado, 1 hr (APATA)
9. Agregar SDL, 3 veces x 5 min c/u (APATA)
10. Avidina, 1 hr (APATA)
11. Agregar SDL, 3 veces x 5 min c/u (APATA)
12. DAB, 1 min (APATA y proteger de luz)
13. Agregar dH₂O, 3 veces x 5 min c/u (APATA)
14. Montar tejido bien extendido sobre placas gelatinizadas
15. Permitir secar tejido a temperatura ambiente
16. Sumergir placas con dH₂O, 3 veces x 2 min c/u
17. Sumergir placas en Etanol 70%, 1 vez x 3 min
18. Sumergir placas en Etanol 80%, 1 vez x 3 min
19. Sumergir placas en Etanol 90%, 1 vez x 3 min
20. Sumergir placas en Etanol absoluto, 2 vez x 3 min
21. Sumergir placas en Xilol, 3 vez x 3 min
22. Aplicar Medio de Montaje y colocar cubreobjetos
23. Dejar secar a temperatura ambiente y observar al microscopio de campo claro

11.2. ANEXO 2. Estadística descriptiva e inferencial de parámetros morfológicos.

11.2.1. Número de procesos en células PV+

11.2.1.1. Corteza cerebral

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	1.93	1.84	1.68	1.84	1.59
Desviación estándar	0.80	0.75	0.79	0.82	0.85
Error estándar	0.09	0.09	0.08	0.09	0.09

Prueba Kruskal-Wallis	
Estadístico Kruskal-Wallis	13.31
P valor	0.0099

Prueba de comparación múltiple de Dunn		
Tratamientos comparados	Diferencia de rango medio	p-valor
Control vs. Vehículo	10.52	>0.999
Control vs. 250 mg/Kg	-39.50	0.193
Control vs. 500 mg/Kg	-15.01	>0.999
Control vs. 1000 mg/Kg	-55.40	0.019
Vehículo vs. 250 mg/Kg	-28.97	0.861
Vehículo vs. 500 mg/Kg	-4.48	>0.999
Vehículo vs. 1000 mg/Kg	-44.87	0.120
250 mg/Kg vs. 500 mg/Kg	-24.49	>0.999
250 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	15.90	>0.999
500 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	40.39	0.2464

11.2.1.2. CA1

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	2.29	1.92	1.96	2.22	1.73
Desviación estándar	0.86	0.82	0.82	0.70	0.70
Error estándar	0.10	0.09	0.09	0.10	0.08

Prueba Kruskal-Wallis	
Estadístico Kruskal-Wallis	22.09
P valor	0.0002

Prueba de comparación múltiple de Dunn		
Tratamientos comparados	Diferencia de rango medio	p-valor
Control vs. Vehículo	47.29	0.057
Control vs. 250 mg/Kg	-40.91	0.137
Control vs. 500 mg/Kg	-7.87	>0.999
Control vs. 1000 mg/Kg	-68.61	0.0007
Vehículo vs. 250 mg/Kg	6.39	>0.999
Vehículo vs. 500 mg/Kg	39.42	0.208
Vehículo vs. 1000 mg/Kg	-21.32	>0.999
250 mg/Kg vs. 500 mg/Kg	-33.03	0.456
250 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	27.71	0.912
500 mg/Kg vs. 1000 mg/Kg	60.74	0.004

11.2.1.3. CA3

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	2.14	2.04	2.13	1.89	1.75
Desviación estándar	1.07	0.82	0.85	0.78	0.79
Error estándar	0.40	0.09	0.15	0.26	0.11

Prueba Kruskal-Wallis	
Estadístico Kruskal-Wallis	6.749
P valor	0.1498

11.2.1.4. Hilus

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	1.70	1.41	1.62	1.68	1.67
Desviación estándar	0.65	0.55	0.72	0.77	0.81
Error estándar	0.08	0.08	0.11	0.11	0.11

Prueba Kruskal-Wallis	
Estadístico Kruskal-Wallis	5.032
P valor	0.284

11.2.2. Área del soma de células PV+

11.2.2.1. Corteza cerebral

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	119,20	123,60	107,10	115,40	124,50
Desviación estándar	25,27	29,70	21,08	23,36	35,19
Error estándar	2,81	3,30	2,08	2,63	3,91

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	7,288 (4,000, 202,4)
P valor	<0,0001

Prueba de múltiple comparación Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	2,486	158,600	0,0991
250 vs. 1000	3,928	123,800	0,0013
250 vs. Control	3,460	155,100	0,0062
250 vs. Vehículo	4,247	138,900	0,0004
500 vs. 1000	1,924	139,400	0,3097
500 vs. Control	0,977	157,600	0,8653
500 vs. Vehículo	1,951	151,300	0,2953
1000 vs. Control	1,102	145,200	0,8050
1000 vs. Vehículo	0,163	155,600	0,9998
Control vs. Vehículo	1,033	156,000	0,8399

11.2.2.2. CA1

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	169,00	188,90	169,30	188,30	169,50
Desviación estándar	47,69	49,34	50,10	46,35	47,37
Error estándar	5,62	5,62	5,34	5,43	5,47

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	3,668 (4,000, 188,8)
P valor	0,0067

Prueba de comparación múltiple Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	2,501	157,100	0,0956
250 vs. 1000	0,023	159,200	>0,9999
250 vs. Control	0,034	154,400	>0,9999
250 vs. Vehículo	2,528	160,700	0,0896
500 vs. 1000	2,448	146,000	0,1085
500 vs. Control	2,471	142,700	0,1031
500 vs. Vehículo	0,072	148,000	>0,9999
1000 vs. Control	0,056	144,700	>0,9999
1000 vs. Vehículo	2,476	150,000	0,1016
Control vs. Vehículo	2,499	146,800	0,0964

11.2.2.3. CA3

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	156,60	189,20	185,30	202,80	175,60
Desviación estándar	35,29	56,89	54,26	72,86	51,55
Error estándar	13,34	6,66	9,75	24,29	6,89

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	1,505 (4,000, 27,39)
P valor	0,2281

11.2.2.4. Hilus

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	159,20	155,30	163,80	171,60	180,90
Desviación estándar	53,17	50,09	45,08	56,09	58,65
Error estándar	6,86	7,73	6,72	7,93	8,13

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	1,672 (4,000, 119,8)
P valor	0,161

11.2.3. Forma de células PV+

11.2.3.1. Corteza cerebral

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	0,7438	0,6101	0,5679	0,6409	0,6263
Desviación estándar	0,1068	0,0962	0,1264	0,1073	0,1099
Error estándar	0,0105	0,0108	0,0141	0,0119	0,0122

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	32,43 (4,000, 206,4)
P valor	<0,0001

Prueba de comparación múltiple Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	8,854	175,400	<0,0001
250 vs. 1000	10,020	156,400	<0,0001
250 vs. Control	6,473	171,600	<0,0001
250 vs. Vehículo	7,287	169,600	<0,0001
500 vs. 1000	2,381	149,200	0,1262
500 vs. Control	1,909	156,900	0,3166
500 vs. Vehículo	0,991	156,200	0,8591
1000 vs. Control	3,961	155,900	0,0011
1000 vs. Vehículo	3,137	157,000	0,0172
Control vs. Vehículo	0,854	159,900	0,9131

11.2.3.2. CA1

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	0,5296	0,5104	0,6411	0,5075	0,4716
Desviación estándar	0,1449	0,1332	0,1205	0,1280	0,1461
Error estándar	0,0171	0,0152	0,0129	0,0150	0,0169

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	21,54 (4,000, 187,2)
P valor	<0,0001

Prueba de comparación múltiple Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	6,769	149,800	<0,0001
250 vs. 1000	7,996	143,600	<0,0001
250 vs. Control	5,220	138,000	<0,0001
250 vs. Vehículo	6,574	154,600	<0,0001
500 vs. 1000	1,593	144,400	0,5045
500 vs. Control	0,971	140,400	0,868
500 vs. Vehículo	0,134	148,000	>0,9999
1000 vs. Control	2,416	144,800	0,1169
1000 vs. Vehículo	1,709	147,900	0,4314
Control vs. Vehículo	0,840	143,700	0,9176

11.2.3.3. CA3

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	0,5714	0,4593	0,6035	0,4400	0,4907
Desviación estándar	0,1232	0,1378	0,1599	0,1064	0,1395
Error estándar	0,0466	0,0161	0,0287	0,0355	0,0187

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	5,651 (4,000, 27,30)
P valor	0,0019

Prueba de comparación múltiple de Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	3,584	19,670	0,0145
250 vs. 1000	3,296	55,280	0,0142
250 vs. Control	0,587	11,110	0,9743
250 vs. Vehículo	4,379	49,860	0,0006
500 vs. 1000	1,265	12,890	0,7154
500 vs. Control	2,245	11,960	0,2282
500 vs. Vehículo	0,496	11,600	0,9862
1000 vs. Control	1,609	8,056	0,5305
1000 vs. Vehículo	1,273	117,800	0,7080
Control vs. Vehículo	2,275	7,518	0,2504

11.2.3.4. Hilus

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	0,5758	0,5131	0,6584	0,5526	0,4923
Desviación estándar	0,1393	0,1308	0,1298	0,1388	0,1530
Error estándar	0,0180	0,0202	0,0194	0,0196	0,0212

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	10,41 (4,000, 119,6)
P valor	<0,0001

Prueba de comparación múltiple Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	3,839	92,860	0,0021
250 vs. 1000	5,785	94,970	<0,0001
250 vs. Control	3,127	98,190	0,0193
250 vs. Vehículo	5,199	84,500	<0,0001
500 vs. 1000	2,086	99,670	0,2344
500 vs. Control	0,873	104,600	0,9063
500 vs. Vehículo	1,403	88,790	0,6273
1000 vs. Control	3,003	104,100	0,0271
1000 vs. Vehículo	0,710	91,680	0,9537
Control vs. Vehículo	2,321	91,760	0,1475

11.2.4. Densidad celular

11.2.4.1. Corteza cerebral

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	129,80	154,20	156,80	111,00	117,20
Desviación estándar	30,77	67,34	26,47	22,80	28,03
Error estándar	10,26	22,45	8,82	7,60	9,34

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	4,169 (4,000, 19,72)
P valor	0,0131

Prueba de comparación múltiple de Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	3,931	15,660	0,0093
250 vs. 1000	3,081	15,950	0,0485
250 vs. Control	1,994	15,650	0,3131
250 vs. Vehículo	0,107	10,410	>0,9999
500 vs. 1000	0,514	15,360	0,9847
500 vs. Control	1,473	14,750	0,5939
500 vs. Vehículo	1,823	9,811	0,4132
1000 vs. Control	0,909	15,860	0,8891
1000 vs. Vehículo	1,523	10,690	0,5703
Control vs. Vehículo	0,989	11,200	0,8549

11.2.4.2. CA1

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	148,70	181,60	185,70	128,40	153,70
Desviación estándar	32,75	34,44	43,91	33,61	42,85
Error estándar	10,92	11,48	14,64	11,20	14,28

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	3,537 (4,000, 19,93)
P valor	0,0245

Prueba de comparación múltiple de Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	3,109	14,980	0,0482
250 vs. 1000	1,566	15,990	0,5378
250 vs. Control	2,029	14,800	0,3002
250 vs. Vehículo	0,224	15,140	0,9994
500 vs. 1000	1,392	15,140	0,6417
500 vs. Control	1,295	15,990	0,6980
500 vs. Vehículo	3,313	15,990	0,0309
1000 vs. Control	0,279	14,970	0,9985
1000 vs. Vehículo	1,521	15,290	0,5653
Control vs. Vehículo	2,075	15,960	0,2773

11.2.4.3. CA3

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	182,80	121,30	109,20	61,91	145,80
Desviación estándar	2,32	37,39	25,67	11,90	35,38
Error estándar	1,34	12,46	11,48	6,87	17,69

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	69,20 (4,000, 6,880)
P valor	<0,0001

Prueba de comparación múltiple de Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	3,536	5,872	0,0652
250 vs. 1000	1,736	5,347	0,4859
250 vs. Control	6,368	4,108	0,0134
250 vs. Vehículo	0,710	11,200	0,9500
500 vs. 1000	4,422	3,842	0,0544
500 vs. Control	17,270	2,152	0,0081
500 vs. Vehículo	4,169	9,932	0,0131
1000 vs. Control	2,085	3,034	0,4007
1000 vs. Vehículo	1,136	6,149	0,7844
Control vs. Vehículo	4,912	8,182	0,0071

11.2.4.4. Hilus

Tratamiento	Control	Vehículo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Media	68,80	40,50	113,10	68,94	53,08
Desviación estándar	29,10	27,37	43,84	42,36	18,30
Error estándar	9,70	9,12	14,61	14,98	6,10

ANOVA de Welch	
W (DFn, DFd)	4,562 (4,000, 18,72)
P valor	0,0096

Prueba de comparación múltiple de Games-Howell			
Tratamientos comparados	t	DF	p-valor
250 vs. 500	2,109	14,880	0,2670
250 vs. 1000	3,788	10,710	0,0210
250 vs. Control	2,523	13,900	0,1411
250 vs. Vehículo	4,212	13,410	0,0071
500 vs. 1000	0,981	9,292	0,8576
500 vs. Control	0,008	12,220	>0,9999
500 vs. Vehículo	1,622	11,740	0,5124
1000 vs. Control	1,372	13,470	0,6540
1000 vs. Vehículo	1,147	13,960	0,7799
Control vs. Vehículo	2,126	15,940	0,2570