

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas

JOSÉ DEL CARMEN REJÓN-ORANTES¹, DIANA PLACER PERDOMO², GABRIEL ROLDÁN³

Resumen

En el último año, el Laboratorio Experimental de Farmacobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), ha venido sistematizando pruebas no condicionadas para el estudio de la ansiedad en modelos animales.

En este trabajo se efectúa una revisión bibliográfica que actualiza el conocimiento sobre las pruebas útiles en la evaluación de la ansiedad. Estas pruebas las utilizamos en los trabajos de investigación de extractos vegetales con base en hallazgos etnobotánicos de la medicina tradicional chiapaneca, los cuales se han desarrollado con modestos recursos financieros de la Facultad de Medicina de la Universidad y autofinanciamiento por parte de los investigadores, considerando la generación de conocimiento y la posibilidad de ampliar las expectativas terapéuticas con recursos naturales, como el insumo de mayor valor.

Además, es de interés para el equipo investigador vincular en este proceso a investigadores de otras universidades e instituciones de salud que estén estudiando compuestos extraídos de plantas y que sirvan como base en la obtención de fármacos no sintéticos para tratamiento de la ansiedad en el hombre.

Palabras clave: ansiedad, extractos, alcaloides.

-
- 1 Médico anestesiólogo, candidato a Doctor en Ciencias; profesor titular e investigador, Laboratorio Experimental de Farmacobiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chiapas, México.
 - 2 Médica otorrinolaringóloga, candidata a Maestra en Ciencias; profesora titular e investigadora, Laboratorio Experimental de Farmacobiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chiapas, México.
 - 3 Doctor en Ciencias, profesor titular e investigador, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

Recibido: 30-06-2010

Revisado:01-07-2010

Aceptado:23-08-2010

Title

Non-conditioned tests on mice to evaluate the anxiolytic activity of substances extracted from plants

Abstract

In the last year the Laboratory of Experimental Pharmacobiology at the Medicine Faculty of the Universidad Autónoma de Chiapas UNACH has been setting up several non-conditioned tests for the study of anxiety in animal models.

In this work a literature review updates the knowledge of useful tests in the assessment of anxiety. These tests are used in the research of plant extracts based on ethnobotanical findings of traditional medicine of Chiapas, which have been developed with modest financial resources of the Medical Faculty of the University and self-financing by the researchers, given the knowledge generation and the possibility of extending the therapeutic expectations with natural resources as the most valuable input. It is also of interest to the research team in this process to link researchers from other universities and health institutions who are studying compounds extracted from plants and serve as a basis for obtaining non-synthetic drugs for treatment of anxiety in humans.

Key words: anxiety, extracts, alkaloids.

Introducción

En la actualidad, en los países en desarrollo, los extractos de los órganos de las plantas son usados por gran porcentaje de su población como remedios caseros para su atención primaria en salud[1]. En América, el antecedente etnobotánico más antiguo del uso de plantas como recurso medicinal, se encuentra en el primer documento médico redactado después de la Conquista. El “*Libellus de*

medicinalibus indorum herbis”, manuscrito azteca que data de 1552, escrito en náhuatl por el médico azteca Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, médico xochimilca.

Desde los orígenes del hombre hasta nuestros días, el uso de algunos extractos de plantas ha demostrado tener actividad sobre el sistema nervioso central y, por ello, son utilizados en la medicina tradicional; entre ellos se incluyen los que poseen efectos “tranquilizantes” y se utilizan para tratar la ansiedad[2, 3].

Con base en la medicina tradicional de los diferentes grupos indígenas de Chiapas, el equipo de investigadores del Laboratorio Experimental de Farmacobiología ha explorado plantas que son usadas en la terapéutica nativa, para el tratamiento de diferentes alteraciones del sistema nervioso central, como son los trastornos psicóticos, tóxicos, la depresión y la ansiedad.

Actualmente, se está trabajando con diversas plantas originarias del Estado de Chiapas, que son utilizadas por diferentes grupos indígenas para *curarse* los “cólicos” o “encabronamientos”, manera en que ellos se refieren a los trastornos vinculados con la ansiedad[4].

Las plantas son recolectadas en las zonas de origen de cada grupo indígena, con el objeto de no tener variaciones en la cantidad y calidad de los compuestos que pudieran ser respon-

sables del efecto biológico. A éstas, previamente se les efectúa la clasificación taxonómica; para ello, se cuenta con el apoyo del herbario Eazi Matuda de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, donde se deposita un ejemplar del vegetal en estudio.

Basados en las pruebas empíricas ancestrales sobre el uso de estos extractos como medicamentos suministrados por los curanderos tradicionales a sus “enfermos”, hemos propuesto confirmar el valor terapéutico de estos productos naturales y, dependiendo del órgano de la planta y del tipo de extracto que se va a obtener, se define la metodología empleada.

Uno de los recursos científicos para corroborar el sustento biológico del efecto de los medicamentos tradicionales, es recurrir al uso de pruebas en modelos animales sensibles de manifestar modificaciones de conducta en el sujeto de estudio, al administrarle sustancias con efecto ansiolítico.

La ansiedad es una alteración psiquiátrica que afecta a una gran proporción de la humanidad y que se ha incrementado en los últimos años, siendo atribuible al estilo de vida impuesto actualmente, en el que predomina el ser muy competitivo[5]. Este tema ampliamente estudiado, es complejo y multidimensional. La ansiedad también se define como un estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia

de un estímulo desencadenante. Regularmente, se acompaña de manifestaciones autonómicas como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular e insomnio, entre otras[6]. Diferentes aspectos de la ansiedad están mediados por varios neurotransmisores en distintas áreas anatómicas, primordialmente, sobre el complejo del ácido gamma-aminobutírico/benzodiacepina (GABA/bzd), la noradrenalina y la serotonina. Estos sistemas de neurotransmisores son de importancia crítica en el sistema límbico, incluyendo la amígdala cerebral, la cual es crucial en las respuestas de miedo y la ansiedad. Además, se ha mencionado la importancia de otros neurotransmisores, que modulan esta respuesta de manera directa o indirecta, entre los que se encuentran la colecistocinina, el factor de liberación de la corticotropina y el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal[7].

Durante los últimos 50 años, se ha desarrollado un gran número de pruebas en animales para identificar compuestos que potencialmente tienen actividad ansiolítica. Asimismo, se han hecho utilizando agonistas, antagonistas o ambos, de receptores de los sistemas de neurotransmisores que participan en este proceso, para identificar el mecanismo neuronal por el cual logran este efecto. El utilizar modelos de ansiedad con ratones, ofrece la ventaja de ensayar en ellos diversas técnicas experimentales que en los seres humanos no sería posible. Cuan-

do se exploran extractos y alcaloides (sustancias en estudio) que se extraen de los diferentes órganos de las plantas, por lo regular dichas sustancias se obtienen en cantidades pequeñas y el utilizar ratones permite el óptimo empleo de este recurso.

Nuestro objetivo al realizar esta revisión bibliográfica es actualizar el conocimiento sobre las pruebas no condicionadas en modelos animales útiles para el estudio de sustancias obtenidas de fuentes vegetales, que puedan tener posibilidad de uso terapéutico para tratar la ansiedad.

Metodología para la búsqueda y selección de la información para la revisión

Métodos de obtención de los extractos vegetales

En la medicina tradicional el extracto más utilizado es el acuoso. Sin embargo, regularmente ampliamos la exploración hacia otros tipos de extractos. Para este propósito, se emplean diferentes partes de las plantas, como bulbos, tallos, hojas, flores, frutos, semillas y corteza. Éstas se secan a temperatura ambiente hasta la pérdida total de agua y se muelen finamente[8]. El material obtenido se procesa y, según la metodología elegida, se obtienen extractos acuosos[9], metanólicos[10], etanólicos[11], clorofórmicos o hexánicos[12].

Posteriormente, los extractos acuosos son liofilizados y los obtenidos con solventes volátiles son evaporados al vacío en un rotaevaporador. El producto resultante es envasado en recipientes protegidos de la luz para conservarlos hasta el momento de hacer los bioensayos. Además, se hacen pruebas de precipitación para la detección de alcaloides con los reactivos de Dragendorff y la cromatografía en capa delgada con la técnica de Dragendorff modificada. Cuando obtenemos datos positivos de la presencia de alcaloides, se efectúa la extracción de alcaloides totales, según el procedimiento reportado por González-Esquinca[13].

Pruebas no condicionadas

Las pruebas en roedores se pueden clasificar en condicionadas y no condicionadas. Las primeras requieren necesariamente del entrenamiento exhaustivo de los animales, que son expuestos a estímulos no habituales para determinar efectos sobre la memoria/aprendizaje, el apetito o la función perceptual.

Por el contrario, las pruebas no condicionadas no requieren de entrenamiento, por lo que son menos sensibles a procesos motivacionales y se basan en respuestas espontáneas de la conducta del ratón[14]; éstas han permitido el desarrollo de una serie de paradigmas basados en la observación

de una variedad de conductas del roedor y la mayoría de los procedimientos conductuales para el estudio farmacológico de la ansiedad se basan en este tipo de pruebas[15]. Entre las pruebas de mayor uso se encuentran: la de campo abierto, del laberinto elevado, de la caja luz/oscuridad, de choque/enterramiento, de enterramiento de canicas y del plataforma agujereada. Estas pruebas no requieren de un alto costo económico para su implementación y están al alcance de cualquier laboratorio universitario de investigación.

La prueba de campo abierto, inicialmente descrita por Hall en 1934, valoraba el grado de “emocionalidad” (ansiedad). Consistía en colocar al roedor en un medio ambiente desconocido. De acuerdo con sus observaciones, Hall consideraba que esta respuesta estaba regulada por medio de la actividad del sistema nervioso autónomo (simpático) y tomó como primeras medidas sugerentes de ansiedad a la defecación y la micción.

La prueba ha evolucionado y se ha enriquecido con la aportación de varios investigadores; entre los más sobresalientes, tenemos a Broadhurst (1957, 1958), D’Fries (1964) y Walden (1968)[16].

Actualmente, es ampliamente utilizada para evaluar tanto la ansiedad como la actividad locomotriz; asimismo, es una prueba que permite que

el ratón exhiba un amplio rango de conductas.

La prueba se hace en una caja de vidrio (con paredes y piso transparente de 48 x 48 x 30 cm), cuyo piso se divide con líneas pintadas de color negro formando cuadros de 12 x 12 cm, e iluminada con un foco de luz roja de 15 W[17]. La prueba se registra durante cinco minutos y, generalmente, se toman dos medidas: el total de la distancia recorrida, número de líneas cruzadas marcadas en el piso, considerada como la actividad locomotriz[17], y el tiempo de permanencia en el área central de la caja, en consideración de que el área central de la caja es más amenazante que la periferia, basado en que la permanencia del roedor en el área central es incrementada con fármacos ansiolíticos[18]. Sin embargo, se pueden obtener otros datos de esta prueba, tales como la frecuencia del acicalamiento, de los estiramientos (*reading*), de la micción y de la defecación, así como cualquier conducta bizarra.

Esta información adicional incrementa la posibilidad de dilucidar el perfil farmacológico de las sustancias en estudio. Esta prueba es crucial para poder tomar la decisión de continuar el estudio de las sustancias en estudio con otra prueba no condicionada, ya que estas pruebas son exploratorias y se requiere que la actividad locomotriz no esté afectada; de ser así, y si las

posibilidades lo permiten, se puede ajustar la dosis; de lo contrario, los resultados en las siguientes pruebas para evaluar la ansiedad, carecen de validez.

El laberinto elevado es un modelo válido para evaluar la ansiedad[19-21], porque utiliza estímulos naturales, miedo a los espacios abiertos y miedo caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha, que inducen ansiedad en los humanos[22]; también se considera que el miedo que genera en los roedores se debe a la falta de estímulos tigmotácticos[23].

Originalmente desarrollada con ratas[24], en la actualidad se ha valido su uso con ratones[25]. En este método se utiliza un laberinto en forma de cruz de 30 cm de longitud, con dos extremos cerrados y dos abiertos (15 cm cada extremo), colocado con una elevación del piso de 38,5 cm[14]. La prueba dura cinco minutos; se coloca al ratón en el centro del laberinto con dirección hacia un espacio abierto y se cuantifica el tiempo que permanece en los espacios, así como el número de entradas a cada espacio. El porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos, se calcula para cada animal de la siguiente manera: 100 por tiempo en espacios abiertos/total tiempo de la prueba[26]. La disminución de la actividad exploratoria es causada por miedo a los espacios abiertos y el uso de compuestos ansiolíticos incrementa esta actividad.

La prueba de la caja luz/oscuridad se desarrolló inicialmente para ratones[27]. En este método se usa una cámara de prueba de propileno de 44 x 21 x 21 cm, oscurecida con pintura negra sobre un tercio de su superficie; tiene una abertura de 13 x 5 cm que separa la zona sombreada de la zona sin pintar, la cual se ilumina con una lámpara fluorescente de 22 W.

El principal factor ansiogénico se fundamenta en el conflicto entre el comportamiento exploratorio del ratón y la aversión natural hacia el área abierta e iluminada (brillante) de esta prueba. Al comienzo de la prueba, el animal se coloca en el lado brillante de la caja y se observa su conducta, registrándola en un periodo de 10 minutos; un incremento entre el número de transiciones entre el lado oscuro y brillante, o un aumento en el tiempo de permanencia en el lado iluminado, se considera como un indicativo de la reducción en la ansiedad. Aunque los roedores pueden explorar con libertad ambos compartimientos, muestran una clara preferencia a permanecer en el lado oscuro. Las benzodiazepinas, la buspirona y los antagonistas 5HT₃, entre otros agentes ansiolíticos, incrementan la exploración del área iluminada, así como las transiciones entre ambos compartimientos[28, 29].

La prueba de choque/enterramiento (enterramiento defensivo), se realiza en una caja de 17 x 11 x 13 cm[21], en la que se aloja al ratón durante 30

minutos cada día para habituarlo, durante los cuatro días de aclimatación (sin electrodo). Al quinto día se introduce el electrodo y se realiza la prueba[30]. El piso de la caja es cubierto por 5 cm de aserrín y un electrodo de 4 cm de longitud por 1 cm de diámetro, hecho con dos cables de cobre de 0,5 mm de diámetro que se enrollan en forma independiente 25 veces alrededor de un tubo de teflón. El electrodo se coloca a 1 cm por encima del aserrín a través de un agujero en el centro de una de las paredes frontales de la caja, y se alimenta con un voltaje de 1,5 mA[31].

La prueba dura cinco minutos. Se inicia cuando el ratón recibe la descarga eléctrica del electrodo al entrar en contacto con cualquier parte de su cuerpo. Se evalúan cinco elementos de comportamiento: enterramiento defensivo, movimientos coordinados con sus patas u hocico empujando el aserrín hacia el electrodo; inmovilidad, tiempo que permanece totalmente inmóvil; alzamientos, número de veces que se sostiene sobre sus piernas posteriores con apoyo de sus patas anteriores o sin él sobre alguna pared de la caja; acicalamiento, tiempo que ocupa en limpieza o aseo de su piel con sus patas anteriores o la lengua), y exploración, actividad locomotriz[32].

Se ha probado una variedad de agentes, como las benzodiazepinas (clordiazepóxido, diazepam y midazolán) y los ansiolíticos serotonin-

nérgicos (buspirona, ipsapirona, 8-OH-DPAT, R-(+)-8-OSO₂CF₃-PAT, alnespirona, EMD-68843, flesinoxan, indorenato y metiopentina, S-15535) [24]; potencialmente, suprimen la conducta de enterramiento defensivo de manera dependiente de la dosis, la cual no parece ser secundaria a sedación, incapacidad locomotriz o analgesia, o asociarse a déficit de aprendizaje[33].

La prueba de enterramiento de canicas consiste en colocar al ratón en una caja (se puede utilizar la de campo abierto) con el piso cubierto de aserrín (5 cm), sobre el cual se distribuyen uniformemente 25 canicas de vidrio de 6 mm de diámetro. Se contabiliza el número de canicas que el ratón entierra en el aserrín durante un periodo de 30 minutos[34]. Los roedores usan el material de su caja para enterrar los objetos que consideran nocivos o amenazantes. Sobre esta base, las canicas de vidrio se encuentran entre los estímulos que les ocasiona miedo y aversión. Esto podría ser resultado de la novedad que estos objetos representan en su medio ambiente y el entierro de las canicas se vería como la conducta apropiada porque quita la fuente del estímulo que causa aversión.

La inhibición de esta conducta ha sido propuesta como prueba para identificar compuestos ansiolíticos[35]. Esta prueba es sensible a diazepam, fluoxetina, fluvaxamina (inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina), imipramina, clomipramina

(antidepresivos triciclicos) y mianserina[36], 8-OH-DPAT (agonista del receptor 5-HT_{1A})[36]. Alternativamente, se ha propuesto que el enterramiento es una conducta compulsiva, porque los inhibidores de la recaptura de serotonina que se utilizan para tratar la alteración obsesivo-compulsiva en humanos inhiben esta conducta[37].

La prueba de la plataforma agujereada fue introducida en 1962 por Boisser y Simón[38]. El uso de esta prueba para evaluar sustancias ansiolíticas se basa en la hipótesis de Montgomery (1955)[39] de que la exposición a un nuevo ambiente le crea al ratón un conflicto entre el temor generado por la novedad de la situación y su tendencia natural a explorar[40]. Hay una variedad de diseños[41, 42]; entre ellos, frecuentemente se utiliza una plataforma gris de 40 x 40 cm y 2,2 cm de espesor, con 16 orificios de 3 cm de diámetro distribuidos equidistantemente en la superficie, y puesta sobre un soporte a una altura de 15 cm[43-45].

El ensayo se hace colocando el animal en el centro de la plataforma y se evalúa la actividad durante cinco minutos, registrando el número de veces que el animal espía (*head-dipping*) los orificios. Se considera “espíar” cuando el ratón introduce la cabeza dentro de los agujeros hasta las orejas. Aunque algunos equipos son automatizados y registran las espíadas a los orificios por medio de sensores,

el utilizar sistemas de grabación (*video-tape*) permite obtener una calificación confiable de los resultados. El número de exploraciones guarda una relación inversa con el estado de ansiedad del animal; los compuestos ansiolíticos, como las benzodiazepinas, incrementan de manera dependiente de la dosis, el número y la duración de las espíadas a los orificios[43].

Evaluación conductual

Los experimentos conductuales se llevan a cabo en ausencia del experimentador en un cuarto con temperatura e iluminación reguladas y con amortiguación del sonido, provisto con facilidades para su grabación en video[46]. La cámara de video debe estar colocada en todos los casos de tal manera que permita evaluar la conducta[47]. La evaluación se hace con las filmaciones en video, aunque una toma de registro de los datos en el momento de la prueba también es conveniente. Todos los experimentos se hacen en el mismo horario, cuando se realizan en días subsecuentes y los implementos (laberinto, caja de campo abierto, plataforma agujereada, etc., con excepción de las pruebas de enterramiento) se lavan con detergente después de cada prueba. La formación de los grupos experimentales y la evaluación de la conducta, se hacen en forma aleatoria por un observador ignorante de las condiciones experimentales.

Hacia dónde vamos

Se reconoce que la ansiedad, como alteración generada por el estilo de vida actual, es un problema de salud mundial[5]. El estudio de los extractos y alcaloides purificados de plantas usadas en la medicina tradicional, con el apoyo de pruebas en modelos animales, nos abre la posibilidad de explorar la riqueza etnobotánica de nuestro continente, buscando alternativas terapéuticas[48-50].

La búsqueda de nuestro equipo investigador continuará en pos de obtener resultados que contribuyan a incrementar el conocimiento científico de estas sustancias, su aplicación y futura utilidad para el tratamiento de la ansiedad.

El impacto social esperado de la contribución científica de la Universidad Autónoma de Chiapas y sus investigadores asociados, es lograr que las personas que presentan esta enfermedad común de la sociedad siglo XXI, puedan obtener los recursos terapéuticos a un costo accesible a cualquier nivel socioeconómico.

Agradecimientos

Al Dr. Roberto F. Solís Hernández por su comprometido apoyo a la investigación.

Bibliografía

1. WHO (World Health Organization). Quality Control methods for medicinal plant materials. Geneva, Switzerland. 1998;vii.
2. Evans SR, Hofmann A. *Plantas de los dioses*. Segunda edición. Ljubljana, Slovenia: Fondo de Cultura Económica; 2008;62-3.
3. Hasrat JA, Bruyne T, 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 (lead) products. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49:1145-9.
4. Organización de médicos indígenas del Estado de Chiapas, A.C. (OMIECH). Las plantas medicinales utilizadas por los mayas de los altos de Chiapas. Primera edición. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: Editorial Fray Bartolomé de las Casas, A.C. 2006;7.
5. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J Ethnopharmacol*. 2001;8:165-70.
6. Kidman A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. *Prog Neurobiol*. 1989;32:391-402.
7. Gorman JM, Hirschfeld RM, Ninan PT. New developments in the neurobiological basis of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull*. 2002;36:49-67.
8. Celis CT, Rincón J, Guerrero MF. Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico

- y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 2007;36:11-22.
9. Amos S, Binda L, Chindo BA, Tseja A, Odutola AA, Wamebe C, *et al.* Neuropharmacological effects of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Pharm Biol.* 2003;41:325-9.
 10. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J Ethnopharmacol.* 2001;78:165-70.
 11. Grundmanna O, Nakajima J, Seo S, Butterweck V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:406-11.
 12. de Sousa DP, de Almeida RN. Neuroleptic-like properties of the chloroform extract of *Maytenus obtusifolia* MART roots. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:224-5.
 13. González-Esquinca AR. Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae), análisis fitoquímico de tres especies del Estado de Chiapas. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2001.
 14. Rodgers RJ. Animal models of "anxiety": Where next? *Behavioural Pharmacology.* 1997;8:477-96.
 15. Clement Y, Joubert Ch, Kopp C, Lepicard E, Venault P, Misslin R, *et al.* A principal component analysis study. *Neural Plasticity.* 2007;2007:1-8.
 16. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behav.* 1973;21:205-35.
 17. Sylvania MM, Macedo DS, Melo CT, Monteiro AP, Rodríguez AC. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56:389-93.
 18. Lipkind D, Sakov A, Kafkafi N, Elmer GI, Benjamini Y, Golani I. New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol.* 2004; 97:347-59.
 19. Pérez M, Lara D, Jacobsen KX, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C, *et al.* Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. *Eur J Neurosci.* 2006;23:2749-59.
 20. Pérez M, Hernández-Gómez AM, Arizmendi-García Y, Jacobsen KX, Lara D, Flores-Gracia C, *et al.* Role of the amygdaloid cholecystokinin (CCK)/gastrin-2 receptors and terminal networks in the modulation of anxiety in the rat. Effects of CCK-4 and CCK-8S on anxiety-like behavior and [³H]GABA release. *Eur J Neurosci.* 2007;26:3614-30.
 21. Pérez M, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K. Role of the dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol.* 2010; 90:198-216.
 22. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16:33-6.

23. Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 44:463-9.
24. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985;14:149-67.
25. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 1987;92:180-5.
26. Grundmann O, Nakajima JI, Seo S, Butterweck V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum L.* in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol.* 2006;110:406-11.
27. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;13:167-70.
28. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Taylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry & Behavior.* 1988; 32:777-85.
29. Bill DJ, Coleman J, Hallett I, Middlefell VC, Rhodes KF, Fletcher A. The enantiomers of zacopride: an intraspecies comparison of their potencies in functional and anxiolytic models. *Br J Pharmacol.* 1995;115(5):775-80.
30. Sluyter F, Kortet M, Bohus B, van Oortmerssen A. Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54:113-6.
31. Treit D. A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 36:203-5.
32. Sluyter F, Korte M, Van Baal GCM, De Ruiter AJH, van Oortmerssen A. Y chromosomal and sex effects on the behavioral stress response in the defensive burying test in wild house mice. *Physiology and Behavior.* 1999; 67:579-85.
33. De Boer SF, Koolhaas JM. Defensive burying in rodents: Ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:145-61.
34. Ichimaru Y, Egawa T, Sawa A. 5-HT1A-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1995; 68:65-70.
35. Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;38:63-7.
36. Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology.* 2002;163:121-41.
37. Matsushita M, Egashira N, Harada S, Okuno R, Mishima K, Iwasaki K, *et al.* Perospirone, a novel antipsychotic drug, inhibits marble-burying behavior via 5-HT1A receptor in mice: Implications for obsessive-compulsive

- disorder. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99:154-9.
38. Ariza SY, Rincón J, Guerrero MF. Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tyttha Leonard.* *Rev Col Cienc Quím Farm.* 2006;35:106-19.
 39. Saitoh A, Hirose N, Yamada M, Yamada M, Nozaki Ch, Oka T, *et al.* Changes in emotional behavior of mice in the hole-board test after olfactory bulbectomy. *J Pharmacol Sci.* 2006; 102:377-86.
 40. Lourenço da Silva A, Elisabetsky E. Interference of propylene glycol with the hole-board test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2001;34:545-7.
 41. Ohl F, Holsboer F, Landgraf R. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Meth Instrum Comput.* 2001;33:392-7.
 42. Kameia J, Matsunawaa Y, Miyataa S, Tanakab S, Saitoha A. Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test. *Eur J Pharmacol.* 2004;489:77-87.
 43. Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol.* 1998;350:21-9.
 44. Sonavane G, Sarveiya V, Kasture V, Kasture SB. Behavioural actions of *Myristica fragrans* seeds. *Indian J Pharmacol.* 2001;33:417-24.
 45. Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Different effects of 5-HT1A receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: A study using the hole-board test. *Psychopharmacology.* 2000; 152:157-66.
 46. Jung JW, Ahna NY, Oha HR, Lee BK, Lee KJ, Kimb SY, *et al.* Anxiolytic effects of the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla.* *J Ethnopharmacol.* 2006;108:193-7.
 47. Kim WK, Jung JW, Ahn NY, Oh HR, Lee BK, Oh JK, *et al.* 2004. Anxiolytic-like effects of extracts from *Albizia julibrissin* bark in the elevated plus-maze in rats. *Life Sciences.* 2004; 75:2787-95.
 48. Huang F, Xiong Y, Xub L, Maa S, Doua Ch. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus schisandrae* in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:471-5.
 49. Ayoka AO, Akomolafe RO, Iwalewa EO, Akanmub MA, Ukponmwan OE. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias bombin L.* (Anacardiaceae) in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:166-75.
 50. Both FL, Meneghini L, Kerber VA, Henriques AT, Elisabetsky E. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT2A/C serotonin modulator. *J Nat Prod.* 2005;68:374-80.