

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO E INDUCCIÓN A
CALLOGÉNESIS DE *Phlegmariurus taxifolius* PARA
LA PRODUCCIÓN DEL ALCALOIDE
ANTICOLINESTERÁSICO HUPERZINA A”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN FARMACIA

PRESENTA:

M.F. TALIA RODRÍGUEZ SALGADO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO 2020

Este trabajo de investigación como parte del Doctorado en Farmacia se realizó en el LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PLANTAS MEDICINALES, Centro de Investigación en Biotecnología CEIB-UAEM.

DEDICATORIAS

A tí donde quiera que estés, gracias por impregnarme de ese gran ímpetu científico y académico, siempre serás mi infinita inspiración.

¡A tí mi más grande maestro de las neuronas, gracias por todo el increíble apoyo, eres el mejor! También te admiro mucho!

AGRADECIMIENTOS

Al distinguido Comité Tutorial y al Jurado Evaluador por sus apreciables y relevantes aportaciones a este trabajo.

A la Facultad de Farmacia y a la UAEM, no solo por seguir cultivando mi espíritu académico y de investigación sino también por ese gran sentido humanista que nos construye como profesionistas.

A todos mis grandes maestros de la Facultad de Farmacia, gracias por compartirnos siempre de sus sabios conocimientos, porque lo que me caracteriza como Académica es por seguir sus ilustres ejemplos como profesores.

Gracias al Dr. Julio César Rivera, Jefe de Posgrado y a la Maestra Rosario por todo su gran apoyo en las cuestiones administrativas, por toda la valiosa gestión y realización de trámites.

Al CONACyT por la beca otorgada durante el trabajo doctoral con número de becario 239393, y por el apoyo de la beca de movilidad internacional para la realización de una estancia en el extranjero en la UFRGS en Brasil.

A la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a la Dra. Miriam y Teresinha por hacer una estancia académica y de investigación única y por todas las grandes enseñanzas en su laboratorio. Gracias a Roger y Dudú por su tiempo y por los conocimientos compartidos en el lab. Gracias a todos los chavos del lab y de la casa de estudiantes por la gran amistad. Y un agradecimiento especial a Betty por la gran hospitalidad.

Al CEIB-UAEM y al Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales por los recursos e infraestructura para la realización del proyecto.

A los integrantes del Comité Tutorial (Dra. Vero, Alexandre y Dra. María Luisa Villarreal), por ser científicos ejemplares y excelentes personas, gracias por todas sus contribuciones durante la realización del proyecto.

A los Drs. Nahim y Roberta, gracias por todas sus valiosas enseñanzas y aportaciones a este trabajo es invaluable su trabajo, los admiro mucho!

Al Dr. Caleb gracias por todo enorme apoyo, entusiasmo y amistad, gracias por todo además de enseñarme a escribir una patente.

Al maestro Milton por todo el apoyo, motivación y gestión de los trámites para la solicitud de la patente.

A mis grandes amigos de vida Nin, Marvin, Rob, Nan y Charlie realmente los quiero y admiro mucho, gracias por acompañarme en este caminar de la vida.

A mi inquebrantable soporte, mi familia, Chimo y todos mi lindos hermanitos, los amo!

ÍNDICE GENERAL

Índice general	I
Índice de contenido	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas.	VI
Símbolos y abreviaturas	VII
Resumen	X

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	
2.1 El papel de la medicina tradicional y las plantas en descubrimiento de fármacos.....	2
2.2. Productos naturales como fuentes naturales clásicas.....	4
2.2.1 Plantas medicinales y sus metabolitos secundarios.....	5
2.2.2. Plantas Medicinales y sus usos en diversos padecimientos.....	7
2.3 La Demencia en el Mundo.....	8
2.3.1 Epidemiología de la Demencia a nivel mundial y nacional.....	11
2.3.1.1 Envejecimiento poblacional mundial y nacional.....	11
2.3.2 Costos Demencia en poblacional mundial y nacional.....	12
2.4 Alzheimer como principal forma de Demencia.....	12
2.4.1 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer.....	13
2.4.2 Descripción de la Enfermedad de Alzheimer.....	15
2.4.3 Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer.....	16
2.4.4 Síntomas.....	16
2.4.5 Estadios de la enfermedad de Alzheimer.....	18
2.4.7 Mecanismo Molecular (Fisiopatología).....	19
2.4.8 Teorías de la EA.....	19
2.4.8.1 Factores involucrados en la teoría química.....	19
2.4.8.2 Defectos en la función mitocondrial.....	19
2.4.8.3 Exceso de productos químicos tóxicos.....	19
2.4.8.4 La contaminación del aire.....	19
2.4.8.5 Teoría genética.....	20
2.4.8.6 Generación de anticuerpos por teoría autoinmune.....	20
2.4.8.7 Teoría del virus lento.....	20
2.4.8.8 Teoría de los vasos sanguíneos al afectar los astrocitos.....	20
2.4.8.9 Hipótesis de AD.....	20
2.4.8.10 Proteína precursora amiloide (APP).....	21
2.4.8.10 Los cambios conformacionales de A β	21
2.4.8.11 Función Abeta.....	21

2.4.8.12 Mecanismo de desregulación de la homeostasis intracelular de Ca ²⁺	22
2.4.8.13 Hipótesis Tau: Proteínas Tau, isoformas y su fosforilación.....	22
2.4.8.14 Hipótesis GSK3.....	22
2.4.8.15 Neurotoxicidad por glutamato.....	23
2.4.8.16 Hipótesis de estrés oxidativo asociada a iones metálicos.....	23
2.4.8.17 Hipótesis colinérgica.....	23
2.5 Factores de Riesgo.....	24
2.6 Tratamiento Farmacológico.....	24
2.7 Tratamiento convencional.....	25
2.8 Agentes terapéuticos utilizados en AD.....	26
2.8.1 Moduladores de la transmisión glutamatérgica.....	26
2.8.2 Anticolinesterásicos.....	27
2.8.2.1 Acetilcolina y Sinapsis colinérgica.....	28
2.8.3 Inhibidores de la AChE y la hipótesis colinérgica de la EA.....	32
2.8.4 Mecanismo de acción de los Anticolinesterásicos.....	32
2.8.5 Clasificación de los Anticolinesterásicos	34
2.8.6 Efectos adversos de los iAChE´s.....	36
2.8.7 Eficacia de los iAChE´s.....	36
2.9 Recomendaciones en el tratamiento farmacológico en el EA	36
2.10 Otros Agentes Terapéuticos	37
2.11 Plantas medicinales en el tratamiento de la EA.....	39
2.12 Papel de la etnobotánica.....	39
2.13 Relevancia etnofarmacológica en la EA.....	43
2.14 Huperzina A (HupA).....	44
2.14.1 Mecanismo de Acción de la HupA.....	45
2.14.2 Propiedades Farmacológicas	45
2.14.2.1 Efectos Colinérgicos de la HupA.....	45
2.14.3 Efectos No Colinérgicos de la HupA.....	46
2.14.4 Efectos no colinérgicos de la HupA en la EA.....	47
2.14.5 Fuentes de huperzina A.....	48
2.15 <i>Pteridofitas</i>	48
2.15.1 Género <i>Phlegamriurus</i>	49
2.15.2 <i>Phlegamriurus taxifolius</i>	50
2.15.3 Estudios Fitoquímicos de <i>Phlegmariurus</i>	51
2.15.1 Alcaloides	51
2.15.2 Terpenoides.....	52
2.15.2.1 Triperpenos.....	52
2.15.2.2 Diterpenos.....	52
2.16 Micropropagación de plantas medicinales.....	56
2.17 Callogénesis	57

2.17.1 Formación de callos <i>in vitro</i> y en la naturaleza.....	57
2.17.2 Callos inducidos por heridas.....	57
2.17.3 Tumores inducidos por patógenos.....	58
2.17.4 Callos formados bajo condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	58
2.17.5 Inducción de callos <i>in vitro</i> mediante fitorreguladores.....	58
2.18 Condiciones de cultivo.....	59
2.18.1 Medios de cultivos.....	59
2.18.2 Extractos de metabolitos bioactivos producidos <i>in vitro</i>	61
2.19 Cultivo <i>in vitro</i> de Pteridofitas.....	61
2.19.1 Cultivo <i>in vitro</i> de especies de <i>Lycopodium</i>	62
2.19.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Huperzia</i> y <i>Phlegmariurus</i>	62
3. Justificación	66
4. Hipótesis.....	67
5. Objetivos.....	68
5.1 General.....	68
5.2 Particulares.....	68
6. Materiales Y Métodos.....	69
6.3 Obtención del extracto total de alcaloides.....	70
6.4 Aislamiento y purificación de los alcaloides y de los compuestos de interés.....	71
6.4.1. Purificación del compuesto T1.....	72
6.4.2. Purificación del compuesto T2.....	73
6.4.3. CCA 8 y CCA11.....	74
6.5 Identificación y elucidación estructural.....	74
6.6 Evaluación de la Actividad Anticolinesterásica.....	75
6.7 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. taxifolius</i>	75
6.7.1 Desinfección de <i>P. taxifolius</i> para obtención de explantes axénicos.....	75
6.7.2. Preparación / Selección de explantes.....	75
6.7.3. Protocolo de Desinfección.....	76
6.7.3.1. Estandarización del Protocolo de Desinfección.....	76
6.7.4. Determinación de la Viabilidad celular de los Explantes Axénicos.....	80
6.8 Inducción a Callogénesis.....	80
6.8.1 Preparación de los Medios de Cultivo.....	80
6.8.2. Combinaciones Hormonales y diseño del experimento PB.....	81
6.8.3. Ajuste del pH y enriquecimiento de los diferentes medios de cultivo.....	82
6.8.4. Preparación / Selección de explantes.....	82

6.8.5. Condiciones de cultivo en la inducción de callos.....	82
6.8.6. Determinación de la viabilidad celular de las Células desdiferenciadas.....	82
6.7.11. Extracción de alcaloides en Células desdiferenciadas.....	83
7. Resultados.....	84
7.1 Análisis fitoquímico.....	84
7.1.1. Identificación y extracción de alcaloides totales de <i>P. taxifolius</i>	84
7.1.2. Aislamiento y purificación de los alcaloides y de los compuestos de interés.....	84
7.1.2.1. Purificación del compuesto T1.....	86
7.1.2.2. Purificación del compuesto T2.....	89
7.1.2.3. Purificación del compuesto T3.....	92
7.1.2.4. CCA 8 y CCA11.....	95
7.2 Identificación y elucidación estructural.....	96
7.2.1 Identificación estructural del compuesto T3.....	96
7.3 Evaluación de la Actividad Anticolinesterásica.....	98
7.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. taxifolius</i>	99
7.4.1. Tratamientos de desinfección de <i>P. taxifolius</i>	99
7.4.2. Estandarización del Protocolo de Desinfección.....	99
7.4.3 Determinación de la Viabilidad celular de los Explantes Axénicos.....	101
7.4.4 Obtención de los explantes axénicos.....	102
7.4.5 Inducción a Callogénesis.....	102
7.4.6 Efecto de diferentes Medios de Cultivo.....	103
7.4.7 Efecto de diferentes pH sobre la inducción de callos.....	103
7.4.8 Efecto de las condiciones de cultivo en la inducción de callos.....	104
7.4.9 Determinación de la viabilidad celular de los callos.....	104
8. Discusión.....	105
9. Conclusiones.....	115
10. Bibliografía.....	117
ANEXO I Solicitud de Patente MX/a/2019/014063	135
ANEXO II Patente: "Método de inducción a desdiferenciación celular de <i>Phlegmariurus taxifolius</i> ".....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1. Estimación de la incidencia de demencia en mayores de 60 años.....	13
Fig. 2.2. Estimación de la prevalencia de demencia en mayores de 60 años.....	15
Fig 2.3. Biosíntesis de la Acetilcolina.....	28
Fig 2.4. Sinapsis colinérgica.....	29
Fig. 2.5. Estructura de los receptores de acetilcolina.....	30
Fig 2.6. Degradación de la Acetilcolina.....	31
Fig. 2.7. Mecanismo de acción de los iAChE.....	33
Fig. 2.8. Principales fármacos utilizados y en investigación para EA.....	38
Fig. 2.9 Alcaloides aislados de <i>Huperzia</i> : a) huperzina A y b) huperzina B.....	44
Fig. 2.10. Resumen de los mecanismos farmacológicos de la Hup A.....	47
Fig. 2.11. Constituyentes químicos (1-34) del género <i>Phlegmariurus</i> (Yang <i>et al.</i> , 2016).....	54
Fig. 2.12. Constituyentes químicos (35-89) del género <i>Phlegmariurus</i> (Yang <i>et al.</i> , 2016).....	55
Fig. 6.1. Procesamiento de los frondes de <i>P. taxifolius</i>	69
Fig. 6.2. Esquema de la extracción de alcaloides totales de los frondes de <i>P. taxifolius</i>	71
Fig. 6.3. Esquema general de las CCA1-CCA5 de <i>P. taxifolius</i>	72
Fig. 6.4. Esquema general de las CCAs para la purificación del compuesto T2 y T3	73
Fig. 6.5. Esquema general de las CCA1, CCA10 y CCA11.....	74
Fig. 6.6. Extracción de alcaloides de las células desdiferenciadas de <i>P. taxifolius</i>	83
Fig. 7.1. CCF Fase orgánica de frondas de <i>P. taxifolius</i>	84
Fig. 7.2. CCF de la CCA1: Fracciones 1-14 de frondas de <i>P. taxifolius</i>	85
Fig. 7.3. Esquema general de los rendimientos de las CCA1-CCA5 de <i>P. taxifolius</i>	86
Fig. 7.4. CCF de a) CCA2 y b) CCA3: Comparación entre las Fracciones.....	87
Fig. 7.5. Esquema general de las CCF1-CCF5	88
Fig. 7.6. CCF de las fracciones 2.1, 2.2 de frondas de <i>P. taxifolius</i>	89
Fig. 7.7. Esquema general de los rendimientos de las CCA1, CCA6, CCA7 y CCA8.....	90
Fig. 7.8. CCF de la CCA6 de <i>P. taxifolius</i> : Muestra: fracción 2.1 (CCA6).....	91
Fig. 7.9. CCF de la CCA7 de <i>P. taxifolius</i> : Muestra: fracción 8 (CCA7).....	91
Fig. 7.10. CCF de la CCA8 de <i>P. taxifolius</i>	92
Fig. 7.11. Esquema general de los rendimientos de las CCA1, CCA6, CCA9.....	93
Fig. 7.12. CCF de la CCA6 de <i>P. taxifolius</i>	94
Fig. 7.13. CCF de la CCA 9 de <i>P. taxifolius</i>	94
Fig. 7.14. Esquema general de los rendimientos de las CCA1, CCA10 y CCA11.....	95
Fig. 7.15. Espectro ¹³ C RMN (125 MHz, CDCl ₃) del compuesto T3.....	96
Fig. 7.16. Espectro ¹ H RMN (125 MHz, CDCl ₃) del compuesto T3.....	97
Fig. 7.17. Estructura molecular del compuesto T3 (Triterpeno tipo serratano).....	97
Fig. 7.18 Tratamientos de desinfección.....	100

Fig. 7.19. Tratamientos de desinfección 32-43.....	101
Fig. 7.20. Viabilidad: explantes observados en el microscopio de fluorescencia.....	102
Fig. 7.21. Proceso exitoso de callogénesis	103
Fig. 7.22. Células desdiferenciadas que se observan al microscopio electrónico.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Fármacos de origen vegetal con mayor valor económico.....	7
Tabla 2.2 Factores de riesgo en la enfermedad de Alzheimer.....	24
Tabla 2.3 Aspectos farmacológicos de los agentes en el tratamiento de EA.....	27
Tabla 2.4 Esquema terapéutico según severidad de la EA.....	37
Tabla 2.5 Fitoquímicos y derivados con Efectos farmacológicos y clínicos EA.....	40
Tabla 2.6 Constituyentes químicos del género <i>Phlegmariurus</i> (Yang <i>et al.</i> , 2016).....	53
Tabla 2.7. Constituyentes químicos (82-89) del género <i>Phlegmariurus</i> (Yang <i>et al.</i> , 2016)....	54
Tabla 6.1 Tratamientos de desinfección (1-27).....	77
Tabla 6.2 Tratamientos de desinfección (28-43).....	79
Tabla 6.3 Diseño experimental PB.....	81
Tabla 7.1 Fracciones (1-14) obtenidas la cromatografía en columna abierta 1.....	85
Tabla 7.2 Porcentajes de inhibición de la AChE.....	98
Tabla 7.3 Tratamientos de desinfección 32-43 de frondas de <i>P. taxifolius</i>	100

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AD	Agentes desinfectantes
ADI	Alzheimer's Disease International (Enfermedad de Alzheimer Internacional)
AGE	Productos finales de glicación avanzada
AIA	Ácido indolacético
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANA	Ácido naftaleno acético
anti-EA	Anti- Enfermedad de Alzheimer
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora β -amiloide
APP-CTF β	Fragmentos C-terminales de la proteína precursora β amiloide
CTF β	Fragmento C-terminal β
Ayurveda	Medicina Tradicional Hindú
Aβ	Abeta: β -amiloide
B5	Medio Gamborg de cultivo vegetal
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
BEN	Antifúngico Benomilo
BPSD	Síntomas Fisiológicos de la Demencia
CAT	Colina acetiltransferasa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CHCl₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
cm	Centímetro
cm²	Centímetro cuadrado
CONAPO	Consejo Nacional de Población
Cx	Control
DAF	Diacetato de fluoresceína
DDE	Pesticida Diclodifenildicloroetileno
DDT	Pesticida Diclorodifeniltricloroetano
DMSO	Dimetilsulfoxido

DNTB	Reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico))
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAT	Extracción de los alcaloides totales
ECA	Ensayo Controlado Aleatorio
EM	Esclerosis múltiple
EOAD	Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana
EtOH	Etanol
F.E.	Fase estacionaria
F.M.	Fase móvil
FA	Fase Acuosa
FO	Fase Orgánica
GA₃	Ácido giberélico
GABA	Acido Gama Aminobutírico
GEN	Gentamicina
H₂O_d	Agua destilada
HD	Enfermedad de Huntington
Hup A	Huperzina A
iAChE	Inhibidores de la acetilcolinesterasa
iAChE	Inhibidores de la Acetilcolinesterasa
KNO₃	Nitrato de Potasio
LCR	líquido cefalorraquídeo
LOAD	Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía
MCI	Deterioro cognitivo leve
MetOH	Metanol
mg	Miligramo
MhGAP	Programa de Acción Mundial para Superar las Brechas en Salud Mental
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMSE	Test Mini Examen del Estado Mental
MRI	Imagen de Resonancia magnética
MS	Medio de cultivo vegetal Murashige y Skoog
MTC	Medicina tradicional China

nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaClO	Hipoclorito de sodio
NFT	Ovillos neurofibrilares intracelulares
nm	Nanómetro
NMDA	N-metil-D-Aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Plackett Burman
PDE	Fosfodiesterasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
pH	Potencial de Hidrogeno
PPIs	Interacciones proteína–proteína
PPM	Plant Preservative Mixture ®
Proteína τ	Proteína Tau
PSEN1 y 2	Presenilina 1 y 2
PVP	Polivinilpirrolidona
RAGEs	Receptores de productos avanzados de glicación
Rf	Factor de retención
rM	Receptores Nicotínicos
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-C¹³	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
RMN-H¹	Resonancia magnética nuclear protónica
rN	Receptores Nicotínicos
sAPPα	Alfa secretasa APP
sAPPβ	Péptido soluble APP β
SD	Desviación estándar
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD-1	Superóxido dismutasa 1
TDAH	Trastorno por déficit de atención/hiperactividad
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
μg	Microgramo
μl	Microlitro

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis doctoral se realizó el estudio fitoquímico, farmacológico y biotecnológico de la planta medicinal *Phlegmariurus taxifolius*. Es importante mencionar que existen pocos estudios del género *Phlegmariurus*, y de manera más limitada estudios científicos de la planta *P. taxifolius*. Aunado a esto, la planta es de lento crecimiento, (tardando hasta 15 años) además de que se encuentra en peligro vulnerable de extinción según la UICN. En este trabajo se desarrolla un método de desinfección de explantes de los frondes de *P. taxifolius*, un método sumamente difícil de conseguir y por tal razón existen pocos trabajos reportados al respecto. También se desarrolla un método para la generación y propagación *in vitro* de callos de la planta *Phlegmariurus taxifolius* para la producción de los metabolitos de interés con actividad anticolinesterásica como la Huperzina A. Es importante resaltar que significó un gran logro conseguir la generación de callos de este género, debido a que se trata de una planta inferior, la cual es muy difícil su propagación *in vitro* y por lo tanto la inducción a callogénesis. Como se mencionó, esta planta es un potencial candidato para la producción de huperzina A y alcaloides activos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de callos. En estudios fitoquímicos previos se identificó que esta planta es productora de este alcaloide. Éstos fueron realizados en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El presente trabajo desarrolla un método biotecnológico para la generación y producción de callos de la especie *Phlegmariurus taxifolius* a partir de explantes axénicos. En este trabajo se muestra la formulación de un medio óptimo que permitió la callogénesis mediante el diseño experimental Plackett-Burman, utilizando el medio de cultivo vegetal en medio B5 modificado y enriquecido. Se seleccionaron los fitorreguladores adecuados para inducir callogénesis en *Phlegmariurus taxifolius* y su concentración óptima, así como el ajuste del pH idóneo y las condiciones de luminosidad, lo que permitió la generación de callos viables y friables. Adicionalmente se evaluó la actividad farmacológica anticolinesterásica de fracciones del extracto alcaloideo. En relación al estudio fitoquímico de la planta silvestre, se aislaron y purificaron compuestos mayoritarios llegando a la propuesta estructural de un compuesto novedoso para esta planta, se trata de un triterpeno del tipo serratano.

1. INTRODUCCIÓN

La demencia es un síndrome que actualmente afecta la capacidad para procesar pensamientos de 46 millones de personas en el mundo, además de que la enfermedad de Alzheimer es una de las formas más comunes, siendo responsable de entre un 60 y un 70% de los casos. En este tipo de demencia el deterioro cognitivo progresivo es superior al observado en el envejecimiento y se estima que entre un 5 y 8% de las personas con 60 años o más lo padece en algún momento determinado. Este último se relaciona con la pérdida de la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio, así como con la falta de control emocional, social y motivacional. De acuerdo con los datos reportados por World Alzheimer Report 2015 (ADI Report, 2015), se calcula que cada 20 años este número duplicará ocasionando que la cifra aumente a 131.5 millones para el año 2050.

Una de las dificultades más importantes en el control de la enfermedad de Alzheimer es su diagnóstico temprano, ya que los síntomas clínicos relacionados con su patología (deterioro cognitivo) pueden ser visibles una vez que el daño neuronal progresivo antecede hasta con dos décadas de su comienzo. Esta circunstancia hace imposible la recuperación de las funciones neuronales afectadas, y su control continúa siendo incierto debido a que su etiología es multifactorial (por riesgos genéticos defectos en el gen ApOE4 o mutaciones en presenilinas 1 y 2,) (Gandía *et al.*, 2006), disminución de acetilcolina, por acumulación de placas seniles (compuestas principalmente de péptido β -amiloide fibrilar y neuritas distróficas) y por acumulación de ovillos neurofibrilares (compuestos de proteína TAU hiperfosforilada). Todos estos factores conllevan a la pérdida de las sinapsis y eventualmente la muerte neuronal (Gandía *et al.*, 2006).

Hasta el momento, los fármacos actuales contra el Alzheimer sólo han conseguido disminuir su sintomatología, tratando de suplir el déficit colinérgico, disminuir la agregación del péptido β -amiloide y la proteína TAU hiperfosforilada, así como la inflamación y el estrés oxidativo. Otro dato adicional es que desde el año 2006 no han surgido nuevos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del la EA.

En recientes investigaciones enfocadas en la búsqueda de un tratamiento más efectivo para el Alzheimer, el metabolito secundario denominado huperzina A presente en plantas y hongos endófitos, ha demostrado ser una molécula efectiva para su tratamiento, ya que

presenta múltiples actividades biológicas relacionadas con la patología de la enfermedad (anti- β -amiloide, anti-proteína TAU, anticolinesterásica, antiinflamatoria y antioxidante, entre otras). No obstante, su forma de obtención y el costo de este compuesto continúa siendo un reto biotecnológico, por lo que, hoy en día se realizan esfuerzos relacionados con el mejoramiento de su accesibilidad y asequibilidad.

Phlegmariurus taxifolius es considerada una fuente prometedora de huperzina A, ya que de estudios fitoquímicos realizados en nuestro grupo de trabajo (Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)) se ha logrado identificar este metabolito a partir de la preparación de extractos alcaloideos (Soto, 2016). En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer una línea celular de *P. taxifolius* productora de huperzina A a partir de la inducción de callos friables con diferentes sistemas de cultivo, fitorreguladores, condiciones de pH, luz y oscuridad. Uno de los beneficios importantes obtenidos en este trabajo fue la generación de callos friables con una velocidad de crecimiento mayor al observado en la planta silvestre, ya que esta puede tardar hasta 15 años en crecer. Al mismo tiempo, las células en suspensión de este tejido indiferenciado (callos friables) ofrece un sistema de cultivo *in vitro* biotecnológico ventajoso para la producción del alcaloide huperzina A.

2. ANTECEDENTES

2.1 El papel de la medicina tradicional y las plantas en el descubrimiento de fármacos

La naturaleza ha sido una fuente de productos medicinales durante milenios, con muchos medicamentos útiles desarrollados a partir de fuentes vegetales. A lo largo de los siglos, los humanos han confiado en la naturaleza para atender a sus necesidades básicas, entre las cuales se encuentran los medicamentos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. Los sistemas basados en plantas continúan desempeñando un papel esencial en la atención médica, y su uso por diferentes culturas ha sido ampliamente documentado.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 1985 que aproximadamente el 65% de la población mundial dependía predominantemente de medicamentos tradicionales derivados de plantas para su atención primaria de salud, razón por la cual los productos vegetales juegan un papel importante en la medicina, aunque de manera más indirecta. Una

encuesta de compuestos puros derivados de plantas utilizados como medicamentos en los países que albergan Centros de Medicina Tradicional de la OMS indicó que, de 122 compuestos identificados, el 80% se utilizaron para los mismos fines etnomédicos o relacionados y se derivaron de solo 94 especies de plantas. Sin embargo, la diversidad estructural no es la única razón por la que los productos naturales son de interés para el desarrollo de fármacos. Una característica adicional importante es que a menudo poseen actividades biológicas altamente selectivas y específicas basadas en mecanismos de acción. En los últimos años, ha habido un creciente interés en las terapias alternativas y el uso terapéutico de productos naturales, especialmente los derivados de plantas. Los compuestos fitoquímicos se consideran ingredientes, que pueden comercializarse de muchas maneras diferentes. Pueden ser alimentos convencionales, suplementos dietéticos, medicamentos, cosméticos o dispositivos médicos, dependiendo de los atributos del producto terminado (Puglia et al., 2016; Hoffman et al., 2015).

Los gobiernos, las agencias internacionales y las corporaciones están buscando hierbas medicinales prometedoras y productos naturales como fuente rica de nuevos compuestos farmacológicos y un número notable de nuevas entidades químicas aprobadas en los últimos 20 años han sido productos naturales de moléculas pequeñas (Puglia *et al.*, 2016). México es un país multifacético y heterogéneo con alta riqueza cultural y cuenta con el 10 al 12% de la biodiversidad del mundo. Este país ocupa el cuarto lugar en la variedad de plantas vasculares con aproximadamente 31,000 especies diferentes; de este recurso más de 3350 forman parte de la flora medicinal (Mata *et al.*, 2019; Bye & Linares 2016)

En México ocurre concomitantemente una pérdida de biodiversidad, sobreexplotación, biopiratería y regulaciones limitadas sobre el uso de plantas medicinales, que son los principales impedimentos para el crecimiento de la medicina herbal como una industria nacional importante. Por lo tanto, la investigación actual sobre plantas medicinales también debe incluir cuestiones de conservación y la búsqueda sostenible de productos naturales bioactivos basados en el conocimiento tradicional, la regulación y el control de calidad de las especies más importantes. Estas son cuestiones esenciales para el crecimiento de un uso racional de la medicina a base de hierbas (Mata *et al.*, 2019; Soria & Fuentes 2016).

2.2. Productos naturales como fuentes naturales clásicas:

La excepcional complejidad y diversidad molecular de los productos naturales se ha destacado siendo aún más notable el hecho de que estos recursos naturales únicos han sido poco estudiados. A pesar de la intensa investigación de la flora terrestre, se estima que solo el 6% de las aproximadamente 300,000 especies (algunas estimaciones son tan altas como 500,000 especies) de plantas superiores han sido sistemáticamente investigadas, farmacológicamente, y solo un 15% fitoquímicamente. (Cragg & Newman, 2013).

Los productos naturales, a menudo definidos como compuestos derivados de fuentes naturales que poseen actividades biológicas, han sido históricamente una fuente clave e inspiración de medicamentos y lo siguen siendo hasta el día de hoy (Xie et al., 2015). Si bien los productos naturales pueden presentar enormes oportunidades y beneficios en términos de novedad, potencia y selectividad del blanco, también pueden estar asociados con desafíos como la solubilidad, la estabilidad y el aislamiento. La historia de los productos naturales en la medicina nos enseña que estos problemas pueden superarse con frecuencia. El éxito y el progreso continuos requerirán una cooperación interdisciplinaria, un sentido renovado de invención creativa y experimentación, y una voluntad de enfrentar el desafío de hacer que estos medicamentos "difíciles de formular" sean eficaces para los pacientes necesitados (Press et al., 2019). Los productos naturales son una fuente prolífica para el descubrimiento de fármacos (Newman & Cragg 2014) y los métodos tradicionales solo han producido productos naturales conocidos, lo que desafortunadamente indica la necesidad de nuevos métodos que puedan descubrir nuevos productos naturales. (Ren et al., 2017).

Las fuentes naturales son un elemento integral de la atención médica alternativa y el mejor testimonio de su eficacia. El valor cultural es la persistencia de las plantas medicinales en los mercados mexicanos actuales, donde se vende el mayor porcentaje de plantas medicinales y aromáticas. Durante más de 100 años, los investigadores han explorado la flora medicinal mexicana desde los puntos de vista etnobotánico, antropológico, químico, farmacológico y biotecnológico; en algunos casos se han realizado algunas investigaciones clínicas (Mata et al., 2019; Alonso et al., 2017). Los productos naturales se han utilizado en la medicina tradicional en toda la historia de la humanidad. Con sus derivados, los productos naturales comprenden más de un tercio de las nuevas entidades moleculares (NME) aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (Press et al., 2019; Patridge et al., 2015). Algunos desafíos están asociados con muchos productos

farmacéuticos derivados de productos naturales, como las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción deficientes y la estabilidad inadecuada. Esto es, a primera vista, contradictorio, ya que uno de los atractivos de los productos naturales como medicamentos es que uno esperaría que tales compuestos hayan evolucionado en la naturaleza para ser estables en los sistemas biológicos y alcanzar su blanco de manera eficiente para inducir efectos biológicos. Sin embargo, la evolución de tales compuestos en los sistemas vivos ha generado moléculas exquisitamente diseñadas para alcanzar sus objetivos por una ruta particular de suministro y a una concentración local efectiva durante un tiempo específico, que puede no traducirse fácilmente en una dosificación oral en una tableta (Press *et al.*, 2019; Ertl 2017).

Solo se ha explorado una pequeña fracción de la inmensa diversidad del metabolismo de las plantas para la producción de nuevos medicamentos y otros productos importantes para el bienestar humano. La investigación se está expandiendo rápidamente hacia mayor número de especies que para el descubrimiento de metabolitos bioactivos. La explotación de estos recursos se lleva a cabo a través de la bioquímica sintética interdisciplinaria para diseñar vías en los sistemas de plantas y microorganismos para mejorar la producción de medicamentos existentes y para crear bibliotecas de productos biológicamente activos que pueden ser seleccionados para nuevas aplicaciones de fármacos. La vasta biodiversidad química del mundo vegetal ha sido explotada durante miles de años por las culturas humanas para prevenir el dolor, producir placer, usar en ceremonias religiosas y curar diversas enfermedades humanas (De Luca *et al.*, 2012).

2.2.1 Plantas medicinales y sus metabolitos secundarios

Las entidades químicas responsables de la actividad biológica en las plantas son pequeñas moléculas orgánicas que a menudo se forman en un número limitado de especies vegetales, un género, una sola familia o algunas familias. El hecho de que la mayoría de las moléculas individuales estén restringidas en su distribución a un grupo taxonómico particular ha llevado a su clasificación tradicional como metabolitos "secundarios" o más recientemente "especiales" (De Luca *et al.*, 2012; Schillmiller *et al.*, 2008) para diferenciarlos de los metabolitos "primarios" presentes en todas las plantas vivas. La entrega tradicional de tales remedios es a través del consumo de plantas terapéuticas como alimentos o como formulaciones botánicas que son componentes de farmacopeas tradicionales en todo el mundo (De Luca *et al.*, 2012).

Se puede hacer referencia a los metabolitos secundarios como sustancias orgánicas que se encuentran en las plantas, los cuales no tienen un papel definido en los procesos de respiración, asimilación y transporte. Además, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todas las plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades a partir del metabolismo primario y no de forma generalizada; puede estar a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Robles *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de producirse en las plantas en pequeñas cantidades, algunos productos de este metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas que intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas, actuando como atrayentes y repelentes de animales, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas frente a diferentes depredadores. También tienen un importante valor medicinal, económico, en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Ávalos & Pérez 2009). Como ejemplos de estos metabolitos se encuentran los compuestos fenólicos, cumarinas, saponinas, esteroides y alcaloides, entre otros (Robles *et al.*, 2016).

Históricamente se sabe que los metabolitos secundarios son los componentes activos de muchas medicinas tradicionales y han recibido atención continua por sus amplias actividades farmacológicas y / o biológicas, que pueden ser de gran valor terapéutico y potencial en el mercado. Al darse cuenta del potencial terapéutico inherente de los productos naturales, se ha hecho un gran esfuerzo en su estudio, del cual un número considerable de compuestos bioactivos se han aislado e investigado cada año, compilando un vasto recurso para futuras investigaciones. Mientras tanto, se reconoce que los productos naturales y sus derivados representan más de la mitad de los medicamentos aprobados por la FDA, y continúan siendo fuentes ricas para el descubrimiento de medicamentos. Sin embargo, los datos muestran que, incluso a medida que la tecnología se desarrolla y la inversión aumenta sustancialmente, las aprobaciones de nuevos medicamentos a partir de productos naturales no han aumentado en consecuencia, lo que deja a la industria farmacéutica convencional inesperadamente desinformada (Xie *et al.*, 2015).

En contraste, los desarrollos científicos en los países industrializados han llevado a la identificación de los componentes activos individuales involucrados en las plantas y a la producción de medicamentos de un solo ingrediente a través de la síntesis química. Hoy, casi el 25% de las medicinas modernas se derivan de la naturaleza, muchas de las cuales se derivan de usos tradicionales. A lo largo del siglo XX, los medicamentos con ingredientes únicos definidos a partir de extractos naturales fueron reemplazados cada vez más por

moléculas sintéticas, que ahora se usan predominantemente en naciones ricas y científicamente avanzadas. Los países en desarrollo, que comprenden el 80% de la población mundial, dependen principalmente de remedios etnobotánicos. Los productos farmacéuticos más importantes comercialmente relevantes que se derivan de las plantas (Tabla 2.1) están valorados en más de \$ 25 mil millones (EE. UU.) por año (De Luca *et al.*, 2012).

Tabla 2.1 Fármacos de origen vegetal con mayor valor económico (De Luca *et al.*, 2012).

Analgésicos antitusivos	Antiamibico	Anti-colinesterasico	Anti-hipertensivo	Antigota
Codeína Morfina Capsaicina	Emetina	Atropina Hiosiamina Escopolamina	Reserpina	Colchicina
Antimalarico	Antineoplásico	Afrodisiaco	Depresor cardiaco	Cardiotónico
Artemisina Quinina Quinoleína	Campotecina Vinblastina Vincristina Taxol Podofilotoxina	Yoimbina	Quinidina	Digoxina Digitoxina
Inhibidor Colinesterasa	Colinérgico	Contraceptivos Hormonales	Eméticos	Laxativos
Galantamina	Fisostigmina Pilocarpina	Diosgenina Heccogenina Estigmasterol	Ipecac	Senósidos A y B
Anestésico Local	Relajante Muscular	Dejar de fumar		
Cocaína	Tubocurarina	Nicotina		

2.2.2. Plantas Medicinales y sus usos en diversos padecimientos

La búsqueda de metabolitos bioactivos del reino vegetal ha proporcionado muchos productos naturales de beneficio terapéutico. A pesar de que solo entre el 5% y el 15% de las

250,000 especies de plantas estimadas han sido seleccionadas como productos naturales, aproximadamente el 50% de todos los medicamentos derivados de productos naturales se obtienen de fuentes botánicas. Analgésicos como la aspirina y la morfina, antipalúdicos como la quinina y la artemisinina, y los agentes anticancerígenos como el paclitaxel y la vincristina son ejemplos bien conocidos de medicamentos derivados de plantas. La lycophyta *Huperzia serrata* se ha utilizado durante siglos en la medicina popular china para el tratamiento del Alzheimer, la contusión, la tensión, la hinchazón y la esquizofrenia. En 1986, Liu *et al* informaron que el aislamiento del alcaloide (-)-huperzina A de los extractos de esta planta, el cual era el responsable de dicha actividad biológica. La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurológica degenerativa que afecta a más de 46 millones de personas alrededor del mundo (Tun y Herzon 2012). La EA es un trastorno progresivo e identificado como un importante problema de salud a nivel mundial. Las personas con EA y sus cuidadores se ven afectados a nivel personal, emocional, financiero y social. Debido a su impacto significativo y su gran carga para el individuo, las familias de los pacientes y la sociedad, es muy necesario buscar objetivos terapéuticos de retención rentables a largo plazo (Manoharan *et al.*, 2016). La EA representa el tipo de demencia más común en los adultos mayores y cursa con una alteración grave en la memoria y en la funcionalidad de los pacientes. Debido a la importancia de esta enfermedad y el aumento de su frecuencia en la morbilidad, es vital revisar su patogenia, el impacto como principal tipo de demencia en el mundo e investigar sus posibles tratamientos terapéuticos.

2.3 La Demencia en el Mundo.

La población mundial que envejece actualmente comprende casi 900 millones de personas, la mayoría de las cuales viven en países relativamente pobres. El costo mundial estimado de la demencia asciende a US \$ 818 mil millones. (Liang *et al.*, 2018; Mortby *et al.*, 2018). La *demencia* es una enfermedad neurodegenerativa, con diversas causas, que afecta progresivamente la memoria, el pensamiento y la habilidad para realizar actividades de la vida diaria y conduce a un estado de discapacidad y dependencia. El aumento en la incidencia de esta enfermedad hace de las demencias un problema nacional de salud prioritario, para el que debemos tomar medidas urgentes que permitan el desarrollo y la implementación de estrategias enfocadas a la prevención y reducción de factores de riesgo, al diagnóstico oportuno, al tratamiento médico integral, así como a intervenciones sociales y psicológicas que cuenten con algún nivel exitoso de evidencia (Guitierrez *et al.*, 2017) .

Como se mencionó anteriormente la demencia es un síndrome progresivo caracterizado por el deterioro de la función cognitiva o la capacidad para procesar pensamientos. En este síndrome se puede observar la afectación de la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. No obstante, la conciencia no llega a ser afectada durante las primeras etapas de la patología. La demencia puede resultar abrumadora no solo para quienes la padecen, sino también para sus cuidadores y familiares, esto debido a que la falta de concientización y comprensión de la demencia, puede causar estigmatización y ser un obstáculo para la llegada oportuna a los servicios de diagnóstico y atención. El impacto de la demencia en los cuidadores, la familia y la sociedad puede ser de carácter físico, psicológico, social y económico, actualmente es considerada una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas de la tercera edad de todo el mundo. Sin embargo, su desarrollo no necesariamente se relaciona con el envejecimiento, ya que puede ser causada por diversas enfermedades y daños cerebrales primarios o secundarios, como los accidentes cerebrovasculares y la EA (OMS, 2017).

Antes de su inicio, la demencia afecta a cada persona de manera diferente, dependiendo del impacto de la enfermedad y la personalidad del sujeto. Los signos y síntomas relacionados con la demencia pueden describirse en tres etapas: temprana, intermedia y tardía. La **etapa temprana** a menudo pasa desapercibida y dentro de los síntomas se puede observar: la tendencia al olvido, pérdida de la noción del tiempo, desubicación espacial (incluso de lugares conocidos). Por otro lado, en la **etapa intermedia** los signos y síntomas son más limitantes y se comienza con el olvido de acontecimientos recientes y los nombres de las personas. Al mismo tiempo, los enfermos se encuentran desubicados en su propio hogar; presentan dificultades para comunicarse; necesitan de ayuda con el aseo y cuidado; y presentan cambios de comportamiento relacionados con conductas repetitivas (dar vueltas por la casa o preguntar lo mismo una y otra vez). Posteriormente en la **etapa tardía**, la dependencia y la inactividad son casi totales. Las alteraciones de la memoria son graves y los síntomas y signos físicos son aún más evidentes. Dentro de estos últimos se incluye una creciente desubicación en el tiempo y en el espacio, dificultades de reconocimiento de amigos y familiares, mayor necesidad para el cuidado personal y dificultad para caminar, así como alteraciones en el comportamiento que pueden exacerbarse y desembocar en agresiones (OMS, 2017).

Las formas de la demencia son múltiples y diversas y frecuentemente coexisten formas mixtas. Dentro de las formas de mayor incidencia se encuentran la demencia vascular, la

demencia por cuerpos de Lewy (agregados anormales de proteínas en el interior de las células nerviosas) y un grupo de enfermedades que pueden contribuir a la demencia fronto temporal (degeneración del lóbulo frontal del cerebro). Sin embargo, la enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia representando entre un 60% y un 70% de los casos (OMS, 2017). La demencia a nivel mundial ha alcanzado a afectar cerca de 46.8 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos bajos y medios como México. Cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos y se prevé que el número total de personas con demencia alcance los 82 millones en 2030 y 131.5 millones en 2050. Hasta el momento, no existe ningún tratamiento que pueda curarla o revertir su evolución progresiva. Sin embargo, numerosos tratamientos aun en procesos de investigación ya se encuentran en etapas clínicas. En este sentido, algunas intervenciones pueden mejorar la vida de las personas con demencia como su diagnóstico precoz a partir de biomarcadores para posibilitar un tratamiento. Por ejemplo, los biomarcadores de los procesos patogénicos de la enfermedad de Alzheimer participan de manera importante en su diagnóstico y como herramientas para identificar, monitorear y detectar potenciales fármacos y sus efectos secundarios. Estos incluyen el análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) para isoformas de tau y β -amiloide; mediciones de resonancia magnética (MRI) de atrofia cerebral; y técnicas de tomografía por emisión de positrones (PET) para el metabolismo cerebral y el depósito de amiloide- β (Hampel *et al.*, 2010; Oviedo *et al.*, 2016).

Actualmente, la OMS reconoce a la demencia como una prioridad de salud pública y en mayo del 2017, la Asamblea Mundial de la Salud respaldó el Plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública a la demencia 2017-2025. El Plan es un marco integral de referencia para las instancias normativas; los asociados internacionales, regionales y nacionales, y la OMS en las siguientes esferas: la evaluación de la demencia como prioridad para la salud pública; la concientización y la puesta en marcha de iniciativas para satisfacer las necesidades de las personas afectadas; la reducción de riesgos; el diagnóstico, el tratamiento y la atención; los sistemas de información; el apoyo a los cuidadores, y la investigación y la innovación. Las Directrices de la OMS para la reducción del riesgo de deterioro cognitivo y de demencia ofrecen recomendaciones basadas en datos científicos sobre intervenciones que reducen los factores de riesgo modificables de la demencia, como el sedentarismo y las dietas malsanas, así como sobre problemas de salud relacionados con la demencia, como la hipertensión y la diabetes. La demencia es una de las enfermedades prioritarias del Programa de Acción Mundial para Superar las Brechas en Salud Mental (mhGAP, por sus siglas en inglés), un instrumento que pueden utilizar los médicos de

cabecera, sobre todo en los países de ingresos bajos y medianos, para atender directamente a las personas con trastornos mentales, neurológicos o relacionados con el uso de sustancias.

2.3.1 Epidemiología de la Demencia a nivel mundial y nacional

2.3.1.1 Envejecimiento poblacional mundial y nacional

Entre 2015 y 2030, se prevé que haya un incremento de 56% en las personas de 60 años o más a nivel mundial, pasando de 901 millones (M) a 1 400M; y para el año 2050 se estima que se duplicará, llegando a casi 2 100 M. A su vez, el número de personas del estrato más envejecido (80 años y más), está creciendo proporcionalmente más rápido que el resto del número de adultos mayores; las proyecciones indican que en 2050 habrá 434 M de personas pertenecientes a este grupo, lo que equivale a más del triple de los que hay actualmente (125 M). Se prevé que el crecimiento global de la población de 60 años y más sucederá de manera diferencial; así, en los próximos 15 años el número de personas mayores en América Latina y el Caribe tendrá un aumento de 71%, seguido por Asia (66%), África (64%), Oceanía (47%), América del Norte (41%) y Europa (23%). En México este grupo poblacional pasará de tener 12 M de adultos mayores en 2015, a 22 M para 2030 y a 40 M para 2050, lo que representa inicialmente 11.2%, 16.8% en 2030 y la cuarta parte del total de la población en 2050 (Gutierrez et al., 2017).

En 1990 la esperanza de vida en México era de 70 años, se espera que para 2020 sea de 76 años y de 77.2 para 2030, es importante mencionar que el año pasado 2019 la esperanza de vida fue 75.1 según la CONAPO. Los análisis por sexo proyectan que, en estos mismos años, las mujeres alcanzarán una esperanza de vida de 78.4 y 79.5 años, respectivamente, mientras que para los hombres se estima en 73.7 para 2020 y 75 años para 2030. La pirámide poblacional actual presenta una cúspide cada vez más ancha. De acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Geografía y Estadística entre los años 2000 y 2010, la población de adultos mayores creció a una tasa anual de 3.8%. En 2010, el Censo de Población y Vivienda arrojó que hay 10,055,379 adultos mayores de 60 años, lo que corresponde a 9.06% de la población; en la encuesta intercensal 2015, se contaron 119,530,753 habitantes, de los cuales 12,436,321 tienen 60 años y más (10.4%). En la actualidad se calcula que en nuestro país existen más adultos mayores de 60 años que niños de 0 a 4 años y se prevé que esta proporción se duplique para 2029 (Gutierrez et al., 2017). El primer bono demográfico en México se agotará en el año 2030 y con esto habrá un aumento porcentual de ancianos con respecto al 2010 donde se duplicará la cantidad de este grupo etario. De este modo, ocurrirá entonces un aumento de las personas con demencia que pudiera ser desmesurado. En este sentido, se ha calculado que partiendo del 2010, cada 20

años, el número acumulado de personas con demencia se duplicará en el mundo. En 2015, se calculó que existían 46.8 millones de personas con demencia a nivel mundial y esta cifra se casi duplicará cada 20 años. Se estima que para 2030, sean 74.7 millones y en 2050, sea 131.5 millones quienes sufren demencia. Gran parte de este crecimiento de prevalencia se producirá en países emergentes y en vías de desarrollo. En el 2015, aparecieron 9.9 millones de casos de demencia en todo el mundo, uno cada 3 segundos (*ADI Report 2015*; GPC IMSS 2017)

2.3.2 Costos Demencia en poblacional mundial y nacional

Para 2009, Wimo *et al.* estimaron el costo social mundial de la demencia con base en una población total de 34.4 millones de personas con demencia, que alcanzó los 422 billones de dólares, de los cuales 34% (142 billones de dólares) representan cuidado informal, es decir, el realizado en casa por familiares y otras personas cercanas a la persona con demencia. (Guitierrez et al., 2017). En 2010, la ADI (Alzheimer's Disease International) estimó el costo global de la atención de la demencia, incluida la atención informal de familiares y cuidadores, en \$ 600 mil millones. Los costos de atención en Europa y América del Norte representaron el 70% de esta carga. Durante décadas, la demencia ha sido una de las enfermedades más caras en los Estados Unidos en términos de costos totales para la economía; el costo anual de la atención formal para la demencia excede los gastos directos de atención médica para enfermedades cardíacas o cáncer. Se proyecta que para 2040, casi 10 millones de estadounidenses tendrán demencia, incluido el 50% de los mayores de 80 años. (Kogan & Jeong 2018). En el caso de México, según una primera estimación de los costos unitarios de atención a la demencia, siguiendo la trayectoria de atención recomendada por la ADI y asumiendo 10% de adultos mayores con diagnóstico de demencia, el costo de atención reportó un gasto de 3 millones de dólares para 2015, equivalente a 0.010% del presupuesto del sector salud y 0.0003% del producto interno bruto (PIB) (Guitierrez et al., 2017).

2.4 Alzheimer como principal forma de Demencia

Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer fueron identificados por Emil Kraepelin y la neuropatología característica fue observada por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer, quien trabajaba en el laboratorio de Emil. La enfermedad en su conjunto, fue descubierta por Kraepelin y Alzheimer; sin embargo, dada la importancia que Kraepelin daba a las bases neurológicas de desórdenes psiquiátricos, decidió nombrar la enfermedad en honor a Alzheimer. Esta enfermedad clínico-patológica degenerativa crónica y progresiva, se presenta

con deterioro de: la memoria, la orientación, el habla y otras funciones relacionadas con la personalidad y la capacidad visual-espacial. Esta demencia se caracteriza en general por fallo en la consciencia en combinación con amiloidosis cerebral; cambios fibrilares intraneuronales; pérdida neuronal y sináptica; y deficiencias en los neurotransmisores (Hampel *et al.*, 2010). La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad cerebral degenerativa y la causa más común de demencia algunos consideran que comprende 70% -90% (Kogan & Jeong 2018) y en otros estudios se ha estimado entre 60-70% de todos los casos (AD Report 2019). Se caracteriza por una disminución de la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas que afectan la capacidad de una persona para realizar actividades cotidianas (Kogan & Jeong 2018).

2.4.1 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer (EA)

Se estima que 44 millones de personas tienen EA en todo el mundo (2015 & 2019 AD Report). Se ha observado que la incidencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta a medida que la población crece y la vida promedio se alarga. La incidencia de la enfermedad de Alzheimer se duplicará en todo el mundo para el año 2050. Todos los estudios sobre la incidencia de demencia y de EA en particular coinciden en mostrar que se trata de una patología que aumenta con la edad y que presenta un patrón de crecimiento exponencial (Figura 2.1) a partir de los 65 años (Garre 2018).

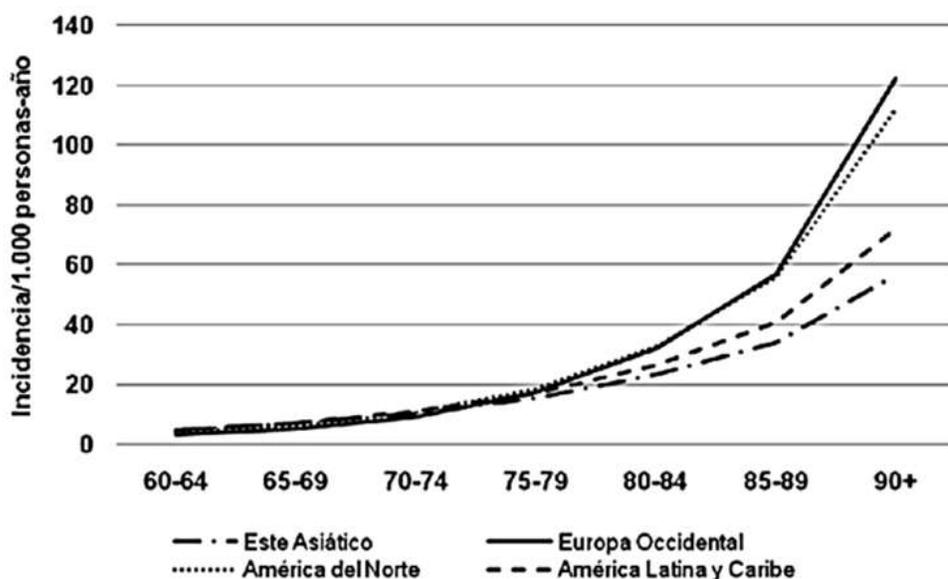


Figura 2.1 Estimación de la incidencia de demencia en mayores de 60 años (adaptado de Alzheimer's Disease International 2015, Garre 2018).

La enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencia siguen siendo un problema de salud desafiante en todo el mundo, especialmente entre los ancianos en los países en desarrollo. Se ha señalado que la prevalencia específica de edad de la enfermedad de Alzheimer se duplica cada 5 años en las personas mayores después de los 65 años. Los estudios epidemiológicos han informado que la incidencia de la enfermedad de Alzheimer en los países en desarrollo fue del 3 al 4%. La incidencia de la enfermedad de Alzheimer en personas mayores de 65 años en áreas urbanas de China fue de entre 3.5 y 4.8%, siendo que Wimo & Prince (2017) señalaron que la prevalencia de demencia aumentará a 65,7 millones para 2030 y a 115,4 millones para el año 2050. La incidencia de la demencia aumenta de la cifra actual de 25 millones a 30 millones para el año 2020 (Rodríguez *et al.* 2014; Manoharan *et al.*, 2016). La incidencia de demencia en India y América Latina rural fue aproximadamente una cuarta parte de las tasas de incidencia en países europeos, siendo la enfermedad de Alzheimer la causa más común (Aprahamian *et al.* 2013). Otros estudios basados en la población en Europa sugirieron que la prevalencia estandarizada por edad en personas mayores de 65 años es del 6.4% de la demencia y del 4.4% de la enfermedad de Alzheimer. En los EE. UU., el estudio de una muestra representativa nacional de personas mayores de 70 años arrojó una prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en un 9,7%. (Manoharan *et al.*, 2016). Por otro lado, De acuerdo con un metaanálisis de 157 estudios epidemiológicos realizados entre 1980 y 2009 en el mundo, la prevalencia de demencia se sitúa, dependiendo de la zona geográfica, entre el 5-8% para mayores de 60 años, muestra un patrón de crecimiento exponencial con la edad, doblándose cada cinco años aproximadamente, y un predominio del sexo femenino (Figura 2.2) (Garre 2018; Prince *et al.*, 2015).

Las tasas de mortalidad y supervivencia globales y específicas son indicadores epidemiológicos muy relevantes desde una perspectiva de salud pública para monitorizar la salud de las poblaciones y describir las consecuencias negativas de las enfermedades a lo largo del tiempo, y contribuyen en la planificación de los recursos sanitarios. De acuerdo con los resultados del Global Burden Disease Study, la EA y las otras demencias son un grupo de enfermedades que durante el período 1990-2013 escaló un mayor número de posiciones entre las 50 principales causas de mortalidad (Christopher & Murray 2015). Actualmente no hay dudas sobre el hecho de que la demencia incrementa el riesgo de mortalidad, y disponemos de información robusta con relación a la demencia en general y según su gravedad. Sin embargo, la supervivencia tras el diagnóstico es muy variable, oscila de media entre 1,1 y 8,5 años (Garre 2018).

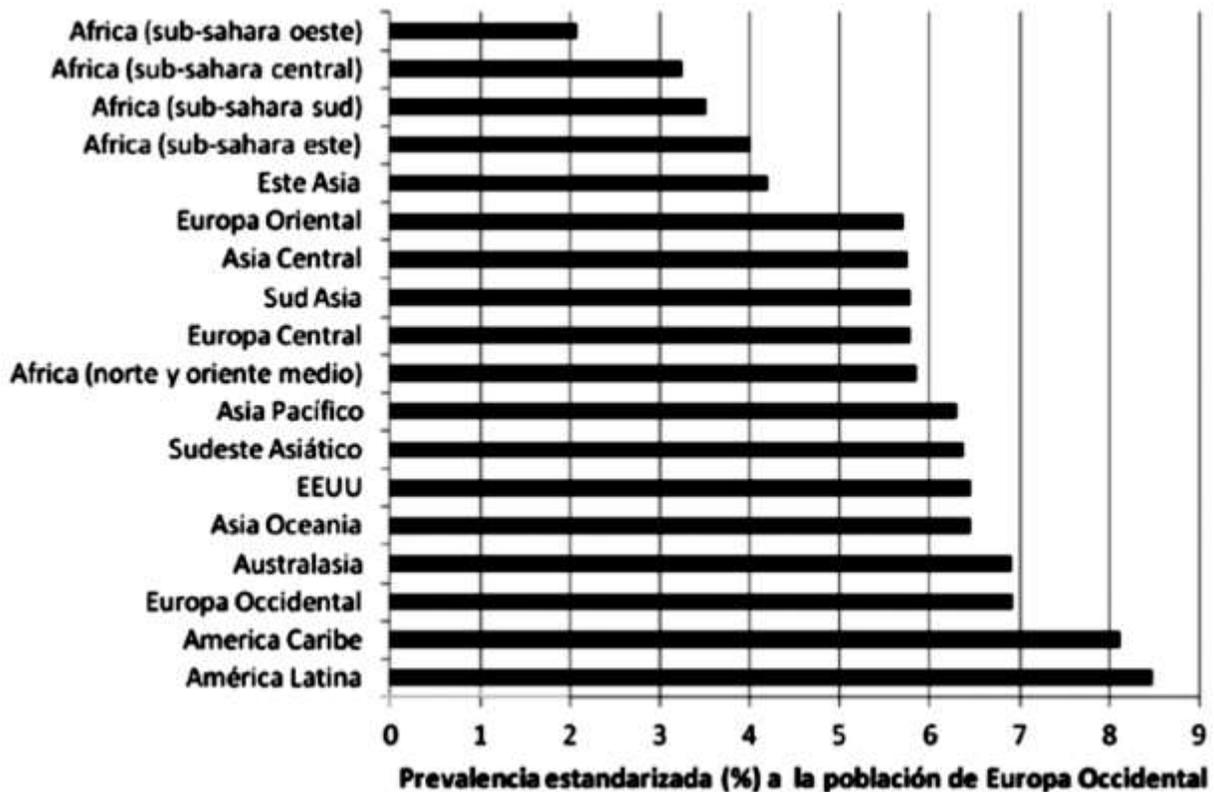


Figura 2.2 Estimación de la prevalencia de demencia en mayores de 60 años (tomado de Garre 2018).

La EA representa actualmente una emergencia social y de salud toda vez que implica no solo la progresión clínica para el paciente sino también las consecuencias en el costo humano y económico. El **costo** de los cuidados a largo plazo, las hospitalizaciones recurrentes, además de los costos secundarios derivados por los cuidados como días laborales perdidos y consecuencias médicas psiquiátricas de los cuidadores, son solo algunos de los problemas socio-económicos que provoca esta entidad (*Alzheimer Association Report, 2016*). Se ha calculado el costo anual *per capita* en México de \$6,157 dólares para el cuidado de una persona con demencia. El gasto catastrófico para la atención de una persona con demencia como la EA, puede mermar hasta el 60 % del presupuesto familiar (*ADI, 2015; GPC IMSS 2017*).

2.4.2 Descripción de la Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo grave, crónico y progresivo asociado con el deterioro de la memoria y la cognición que conduce a la muerte (Akram & Nawaz 2017). La EA es uno de los trastornos más complejos y heterogéneos patológicos y se caracteriza por la presencia de placas seniles (acumulaciones esféricas de

proteínas β -amiloides), ovillos neurofibrilares (compuestos de filamentos helicoidales emparejados y otras proteínas), deterioro de la memoria y capacidad cognitiva. Este trastorno neurodegenerativo progresivo se identifica como un importante problema de salud en casi todos los países. Si bien la demencia se reconoce como las primeras características clínicas, la recuperación de recuerdos distantes se conserva relativamente bien en el curso de la enfermedad. Una vez que la demencia progresa, es más común el deterioro adicional de la capacidad cognitiva, como la capacidad de calcular y la capacidad de usar objetos y herramientas comunes (Manoharan *et al.*, 2016).

2.4.3 Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer

Es una enfermedad clínico-patológica degenerativa crónica y progresiva que se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y funciones cognitivas. Se presenta deterioro a nivel de memoria, orientación, habla, y otras funciones relacionadas con la personalidad y capacidad visual-espacial (Cascales & Gonzalez 2009).

En resumen, la EA clínicamente se caracteriza de manera principal por deterioro de la memoria, afasia, discapacidad, discapacidad visual, disfunción ejecutiva y personalidad, y cambios de comportamiento. Los pacientes que padecen EA tienen una baja capacidad de autosuficiencia, y su enfermedad impone una gran carga a sus familias, cuidadores, sistema de salud e incluso a la sociedad. (Liang *et al.*, 2018). Adicionalmente el daño neuronal eventualmente afecta partes del cerebro que permiten a una persona realizar funciones corporales básicas como caminar y comer. Las personas en las etapas finales de la enfermedad están en cama y requieren atención las 24 horas. La enfermedad de Alzheimer es en última instancia fatal (2015 y 2019 AD Report). El cerebro con enfermedad de Alzheimer muestra múltiples características patológicas, que incluyen placas amiloides, ovillos neurofibrilares, niveles elevados de productos finales de glicación avanzada y su receptor, daño oxidativo e inflamación. El cerebro de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza predominantemente por la presencia de placas seniles y nudos neurofibrilares, que se cree que juegan un papel central en la cascada inflamatoria (Manoharan *et al.*, 2016).

2.4.4 Síntomas

Casi el 60% al 70% de los casos de demencia crónica explican la EA. Se han categorizado tres fases clínicas de EA como fase pre-sintomática, fase pre-demencia y fase de demencia clínicamente definida. El síntoma principal de esta enfermedad es la pérdida de memoria a corto plazo y, con la gravedad cada vez mayor de la enfermedad, conduce a la

disminución del comportamiento cognitivo de la persona afectada (Shakir et al., 2013). Aunque la mayoría de las investigaciones recientes se centran principalmente en la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía (LOAD), las investigaciones recientes también han comenzado a centrarse en la enfermedad de Alzheimer de aparición temprana (EOAD) (Méndez, 2012). La EA se considera la forma neurodegenerativa más común de demencia mientras que la apatía se considera uno de los síntomas más persistentes de la EA y sigue siendo el síndrome neuropsiquiátrico más común en todo el estado enfermo. Otra dificultad que enfrentan los pacientes con EA es el problema de comunicación que se caracteriza por la disminución del nivel de vocabulario y fluidez de las palabras. Se ha encontrado que algunos pacientes afectados desarrollan algunos síntomas delirantes junto con la incontinencia urinaria (Akram & Nawaz 2017).

En la enfermedad de Alzheimer, los síntomas se desarrollan lentamente y empeoran gradualmente con el tiempo. Los principales síntomas incluyen (Manoharan *et al.*, 2016; *Alzheimer Association Report 2015*):

1. Pérdida de la memoria que interrumpe la vida diaria.
2. Dificultad para completar tareas familiares en casa, en el trabajo o en el tiempo libre.
3. Confusión con el tiempo o el lugar.
4. Problemas para comprender imágenes visuales y relaciones espaciales.
5. Dificultad para recordar eventos recientes.
6. Defecto en el comportamiento y las habilidades de pensamiento.
7. Problemas con el lenguaje, nuevos problemas con las palabras al hablar o escribir.
8. Extraviar cosas y perder la capacidad de volver sobre los pasos.
9. Cambios en el estado de ánimo y la personalidad, incluidas la apatía y la depresión; confusión, irritabilidad, agresión y pérdida de memoria a largo plazo.
10. Deterioro en el aprendizaje y el recuerdo de la información recientemente aprendida.
11. Diferencias culturales en la búsqueda de palabras.
12. Agnosia de objetos, reconocimiento facial deteriorado y alexia.
13. Problemas en el Razonamiento, juicio y desafíos en la planificación o resolución de problemas.
14. Retiro del trabajo o actividades sociales.

2.4.5 Estadios de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se desarrolla o avanza de manera gradual. El modelo de siete etapas de la enfermedad de Alzheimer se representa de la siguiente manera:

Etapa 1 Sin deterioro

Etapa 2 Deterioro mínimo / olvido normal

Etapa 3 Deterioro cognitivo precoz confusional / leve

Etapa 4 Confusión tardía / enfermedad de Alzheimer leve

Etapa 5 demencia temprana / enfermedad de Alzheimer moderada

Etapa 6 demencia media / enfermedad de Alzheimer moderadamente grave

Etapa 7 Demencia tardía o severa y falta de crecimiento

2.4.6 Generalidades de la Patogénesis de la EA

Esta enfermedad afecta los tres procesos que mantienen las neuronas sanas: comunicación, metabolismo y reparación. Ciertas células nerviosas dejan de funcionar, pierden conexiones con otras células nerviosas y finalmente mueren. La destrucción y muerte de estas células nerviosas causa el fracaso de la memoria, cambios de personalidad, problemas en la realización de actividades diarias y otras características de la enfermedad (GPC IMSS, 2017). En la actualidad, se han identificado las características patológicas de la EA; inicialmente se desarrollan placas de β -amiloide en el hipocampo, una estructura cerebral que ayuda a codificar los recuerdos, y además en otras áreas de la corteza cerebral que participan en el pensamiento y la toma de decisiones. La acumulación de placas de β -amiloide precede al inicio clínico de la EA. Asimismo, las neuronas sanas tienen una estructura de soporte interna parcialmente formada por estructuras llamadas microtúbulos. Estos microtúbulos actúan como vías, guiando nutrientes y moléculas desde el cuerpo de la célula hasta los extremos del axón y la espalda. Un tipo especial de proteína, llamada proteína tau, se une a los microtúbulos y los estabiliza (Lakham, 2017). En la EA, la proteína tau sufre un cambio químico y se acopla con otros hilos de proteína tau, enredándose entre sí, formando los ovillos neurofibrilares. Cuando esto sucede, los microtúbulos se desintegran, colapsando el sistema de transporte de la neurona y provocando primero el mal funcionamiento en la comunicación entre neuronas y más tarde en la muerte de las células. Los ovillos neurofibrilares, la pérdida de neuronas y la pérdida de sinapsis acompañan a la progresión del deterioro cognoscitivo. A la fecha se desconoce si las placas provocan la EA o si son un subproducto del proceso de esta enfermedad. Adicionalmente se ha encontrado una disminución de la acetilcolina (GPC IMSS, 2017).

2.4.7 Mecanismo Molecular (Fisiopatología)

Según lo descrito por Alois Alzheimer, las características fisiopatológicas de la EA se caracterizan por la generación de placas A β (Abeta: β -amiloide) y NFT en la corteza cerebral y dieron lugar a arteriosclerosis cerebral en las células nerviosas cerebrales responsables de la pérdida de memoria. En la etapa progresiva de AD, estas fibras amiloides se agruparán alrededor de los vasos sanguíneos y, como resultado, el suero sanguíneo se escapa al espacio cerebral causando hemorragia intercerebral, accidente cerebrovascular y muerte. Hay diferentes hipótesis, se resumen conceptos y teorías de AD y aún la fisiopatología de AD todavía no se reconoce por completo.

2.4.8 Teorías de la EA

2.4.8.1 Factores involucrados en la teoría química

2.4.8.2 Defectos en la función mitocondrial. Defectos en la función mitocondrial.

El mecanismo de las neuronas piramidales deficientes en enzimas mitocondriales establece que los defectos en la función mitocondrial pueden causar ADNmt (mutante) en el hipocampo, responsable de disminuir el nivel de varios neurotransmisores en la EA (Moreira et al., 2010).

2.4.8.3 Exceso de productos químicos tóxicos. Las sustancias tóxicas como pesticidas, aditivos alimentarios, contaminación del aire, iones metálicos y algunos compuestos son responsables de la EA. Los iones metálicos trazados como aluminio, plomo y pesticidas como DDT y DDE (un metabolito de DDT) mejoran el desarrollo de proteínas amiloides responsables de enfermedades neurológicas. Las nitrosaminas, los químicos / fertilizantes a base de nitrógeno y los conservantes de alimentos, también son agentes causales de daño neurológico, enfermedades relacionadas con la insulina, enfermedades cardiovasculares causando EA (DeKosky y Gandy, 2014).

2.4.8.4 La contaminación del aire. Hoy en día, la contaminación del aire es una causa importante que produce enfermedades neurológicas. Preclínicamente, se informa el desarrollo de placas A β en el cerebro de ratones cuando se exponen a nanopartículas de níquel en aerosol, un componente de la contaminación del aire. Se ha informado de demencia severa a altos niveles de humo de segunda mano (Moulton y Yang, 2012).

2.4.8.5 Teoría genética

Mutaciones en los cromosomas 1, 14 y 21 se encuentran en la EA y el 10% de EA de aparición temprana (EOAD) se relaciona a mutaciones en el cromosoma 14, mientras que las mutaciones en el cromosoma 12 también se vincularon efectivamente con EA con aparición tardía (LOAD). Hasta ahora, APP, PS1 y PS2 se han identificado como genes mutantes en EOAD, mientras que APOE se han identificado genes mutantes en LOAD (Tang y Gershon, 2003). Actualmente, las asociaciones genéticas representan aproximadamente el 50% de la población que es vulnerable a la EA

2.4.8.6 Generación de anticuerpos por teoría autoinmune.

La sobreexpresión de autoinmunidad de una manera incorrecta afecta sus propios tejidos y generan anticuerpos de sus propias células, lo que puede causar un aumento en la producción de A β y por ende de las placas para matar las células cerebrales en EA (Klein, 2002).

2.4.8.7 Teoría del virus lento

El virus del herpes y la clamidia se han identificado como un agente causante de la EA; ya que producen placas A β pegajosas y proteínas τ (tau) mal plegadas en el cerebro y, por lo tanto, bloquean las neuronas para comunicarse entre sí. Esto puede conducir a la pérdida de memoria y al deterioro cognitivo. El virus del herpes también daña el SNC y el sistema límbico en el cerebro que regula los cambios de humor, instinto y personalidad debido a la mutación de APOEe4 (Itzhaki, 2014).

2.4.8.8 Teoría de los vasos sanguíneos al afectar los astrocitos

Los astrocitos protegen las neuronas contra el daño oxidativo al neutralizar los radicales libres en el envejecimiento y en otros factores de estrés. Los defectos en el suministro de sangre en el cerebro pueden afectar a las neuronas, las células gliales o los astrocitos en el hipocampo como resultado de trastornos neurológicos (Garg et al., 2011).

2.4.8.9 Hipótesis de AD

La teoría y la hipótesis son fenómenos de interconexión y algunas de las hipótesis se ilustran aquí para explicar el mecanismo patológico de la EA que ayuda a desarrollar fármacos.

2.4.8.10 Proteína precursora amiloide (APP) implicada en la hipótesis de la cascada amiloide

En condiciones normales, el gen APP en el cromosoma 21 se escinde por la secretasa α y γ para producir dos péptidos solubles como P3 y la proteína precursora amiloide secretada α (sAPP α) que protege las neuronas contra la excitotoxicidad y regula la proliferación de células madre neurales. Pero, en condiciones anormales, la APP dividida secuencialmente por la secretasa β y γ genera sAPP β y A β insoluble que afectará el parénquima cerebral causando demencia. Esta hipótesis es respaldada por las proteínas presenilina (PSEN1; PSEN2), ya que ambas proteínas están presentes en la β -secretasa y juegan un papel importante en la producción de beta amiloide (A β) a partir de la proteína precursora amiloide (APP). Estas mutaciones de proteínas solo se asocian con el enlace hereditario de la EA (Pagani y Eckert, 2011). En base a esta hipótesis, la búsqueda actual de nuevos agentes terapéuticos apunta a atacar diferentes sitios de beta amiloide (A β) mediante la reducción de la producción de A β , o facilitando la eliminación de A β o evitando la agregación de A β .

2.4.8.10 Los cambios conformacionales de A β .

Existen dos formas principales de A β (Abeta: betamiloide) en formas solubles y fibrilares en el cerebro, es decir, A β 40 y A β 42. Debido a su naturaleza hidrofóbica, A β 42 se pliega y agrega de manera incorrecta para formar una estructura de lámina plegada en β a partir de una conformación helicoidal α y da como resultado placas seniles neurotóxicas (Li et al., 2010). La gravedad de la neurotoxicidad de A β depende del cambio conformacional rápido en la estructura de la hoja β plegada (He et al., 2010).

2.4.8.11 Función Abeta.

Los péptidos beta amiloides (A β o Abeta) que consisten en 36 a 43 aminoácidos están involucrados en gran medida en la EA. La escisión de APP por β secretasa genera un fragmento C-terminal (APP-CTF β), que posteriormente es escindido por γ secretasa para producir Abeta y la sobreproducción de estos péptidos genera péptidos A β . Estos péptidos están mal plegados por oligómeros o por la producción excesiva de los mismos lo que se traduce en la formación de placas A β y del NFT que son tóxicos para las células nerviosas y la pérdida de neuronas.

2.4.8.12 Mecanismo de desregulación de la homeostasis intracelular de Ca^{+2} en la neurotoxicidad $\text{A}\beta$.

El Ca^{+2} es un segundo mensajero que se mantiene en condiciones de homeostasis donde la concentración extracelular es más alta que la concentración intracelular. La interrupción o desequilibrio de los canales de calcio en la membrana celular se produce debido a la generación de placas $\text{A}\beta$ y, como resultado, habrá un aumento en la entrada de Ca^{+2} que puede conducir a la toxicidad del péptido $\text{A}\beta$ en la EA. El Ca^{+2} intracelular sobrecargado paralizará la capacidad de las mitocondrias para amortiguar o ciclar el Ca^{2+} , lo que resulta en toxicidad celular conduciendo a la muerte celular. La desregulación y un mayor desequilibrio en la homeostasis de Ca^{+2} pueden conducir a la peroxidación lipídica y a la generación de radicales libres, ya que se generarán placas seniles neurotóxicas. Hay informes de péptidos beta amiloides ($\text{A}\beta_{1-42}$) en respuesta para inducir una entrada masiva de Ca^{+2} en las neuronas como resultado de que habrá una sobrecarga de Ca^{+2} en las neuronas mitocondriales y muerte celular (Supnet y Bezprozvanny, 2010).

2.4.8.13 Hipótesis Tau: Proteínas Tau, isoformas y su fosforilación.

Las proteínas Tau (proteínas τ) abundan en las neuronas y son responsables de estabilizar los microtúbulos axonales, ubicados en el cromosoma 17 en forma de MAPT (proteína asociada a los microtúbulos τ). En el cerebro humano, la existencia de seis isoformas τ propensas a la fosforilación a medida que avanza la edad debido a la activación de las fosfatasa. En el proceso de fosforilación, un tipo de τ fetal se genera solo en la etapa embrionaria que en el adulto, lo que puede causar ovillos neurofibrilares y placas seniles que provocan EA (Alonso et al., 2001).

2.4.8.14 Hipótesis GSK3.

Las actividades del glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK 3) se han asociado con las características patológicas de la EA mediante la deposición de $\text{A}\beta$ y la formación de NFT. GSK-3 promueve directamente la producción de $\text{A}\beta$ y la hiperfosforilación de las proteínas τ , lo que conduce a los enredos (Schaffer et al., 2003). GSK3 ha sido recientemente objeto de interés en la investigación debido a su participación en varias enfermedades como diabetes tipo II, EA, inflamación, cáncer y trastorno bipolar, metabolismo del glucógeno y transcripción génica. Los inhibidores de GSK-3 se están probando actualmente para efectos terapéuticos en EA. El litio es un inhibidor selectivo de GSK3, utilizado para tratar el trastorno bipolar y actúa como

estabilizador del estado de ánimo en la EA. Pero pocas drogas están diseñadas en base a esta hipótesis.

2.4.8.15 Neurotoxicidad por glutamato.

El glutamato es uno de los aminoácidos involucrados en la construcción de proteínas, es el neurotransmisor más abundante en el sistema nervioso y participa en más del 90% de la transmisión sináptica en el cerebro humano. Los receptores químicos del glutamato son los receptores AMPA, los receptores NMDA y los receptores metabotrópicos de glutamato. Los receptores AMPA son receptores ionotrópicos implicados en la excitación rápida en sinapsis, mientras que los receptores NMDA también son ionotrópicos, pero participan en la activación de Ca^{+2} y ayudan en el aprendizaje y la memoria. En cualquier tipo de mutación por transportadores de glutamato habrá una acumulación de glutamato en una concentración más alta en la sangre que en el cerebro y, como resultado, el cuerpo comienza a bombear glutamatos fuera del torrente sanguíneo hacia las neuronas del cerebro y la activación adicional de los receptores NMDA resulta en la acumulación de Ca^{+2} . El aumento en el nivel de Ca^{+2} aumenta directamente el estrés en las mitocondrias y, como resultado, habrá una fosforilación oxidativa excesiva y la producción de ROS que conducirá a la muerte celular (Simpson et al., 1988). Con base en la hipótesis del calcio y antagonista del receptor NMDA, es posible que se hayan diseñado medicamentos y que actualmente se encuentren en ensayos clínicos.

2.4.8.16 Hipótesis de estrés oxidativo asociada con ciertas concentraciones de iones metálicos.

En el cerebro con EA, el $A\beta$ induce el aumento en el nivel de Fe, Al y Hg que interviene en la generación de ROS, que es responsable del aumento de la peroxidación lipídica / malondialdehído (MDA), disminución de los ácidos grasos poliinsaturados, aumento de 4-hidroxiacetaldehído, aumento de proteínas y oxidación del DNA, disminución del metabolismo energético y disminución de la citocromo c oxidasa, productos finales de glicación avanzada (AGE), son carbonilos, peroxinitrito, hemo oxigenasa-1 y SOD-1 en ovillos neurofibrilares (Zhu et al., 2005).

2.4.8.17 Hipótesis colinérgica.

Establece que las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden ser responsables de la generación de placas $A\beta$ y, como resultado, habrá una reducción en la síntesis del

neurotransmisor colinérgico acetilcolina (ACh) en los ganglios corticales y basales del cerebro. Esto puede afectar la transmisión sináptica que inicia procesos inflamatorios, disminución de la memoria, aprendizaje y muerte celular (Perry, 1986).

2.5 Factores de Riesgo

Estos resultados sugieren la posibilidad de reducir el riesgo de demencia para generaciones futuras según su exposición a factores de riesgo (tabla 2.2) y estilos de vida durante su ciclo vital. En algunos países, las cohortes actuales de personas de 65 años y más son cognitivamente más sanas que sus predecesoras, debido a la reducción en la exposición a factores de riesgo de demencia o mayor exposición a factores protectores (Garre 2018). Se han propuesto distintas hipótesis plausibles para explicar una disminución de la incidencia de demencia, como la mejoría en el control de los factores de riesgo cardiovasculares, un mayor nivel educativo de las nuevas generaciones, cambios en los estilos de vida, caracterizados por un mayor nivel de actividad física, adopción de dietas más saludables y abandono de hábitos tóxicos como el tabaquismo (Livingston *et al.*, 2017).

Tabla 2.2. Factores de riesgo en la enfermedad de Alzheimer (GPC IMSS, 2017, Bibul & Schiper 2011)

CUADRO 1. FACTORES DE RIESGO ENFERMEDAD ALZHEIMER			
TÓXICOS	METABÓLICOS	NUTRICIONALES	COGNOSCITIVOS
<ul style="list-style-type: none"> -Medicamentos -Vacunas -Alcohol -Drogas ilícitas -Metales pesados -Pesticidas -Herbicidas -Metales pesados 	<ul style="list-style-type: none"> -Insulina -Lípidos -Síndrome metabólico -Hormonas sexuales -Hormonas tiroideas 	<p><i>Protectores</i></p> <ul style="list-style-type: none"> -Dieta del mediterráneo -Vitamina E, C, B6, B12 -Folatos -Omega 3 -Café <p><i>Dañinos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> -Homocisteinemia 	<ul style="list-style-type: none"> -Educación -Desarrollo cognoscitivo -Estimulación social -Trauma de cráneo -Enfermedad de Parkinson -Esclerosis lateral amiotrófica -Epilepsia
PSICOLÓGICOS	VASCULARES	INFLAMATORIOS	GENÉTICOS
<ul style="list-style-type: none"> -Estrés -Depresión -Esquizofrenia -Personalidad 	<ul style="list-style-type: none"> -Hipoxia -Isquemia cerebral 	<ul style="list-style-type: none"> -Cistatina C -Anti-inflamatorios no esteroideos 	<ul style="list-style-type: none"> -Trastornos psiquiátricos familiares. -Síndrome de Down -Proteína precursora amiloide. -Prosenilina 1 y 2 -Apolipoproteina E -GSTM 3

2.6 Tratamiento Farmacológico

Todavía no hay un tratamiento efectivo disponible para detener la progresión o prevenir el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Esto podría atribuirse principalmente a la

fisiopatología compleja de la enfermedad de Alzheimer, que es poco conocida. Actualmente existen dos tipos de tratamientos terapéuticos clasificados como tratamiento colinérgico y no colinérgico. El tratamiento colinérgico se trata de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (iAChE), y el no colinérgico, la memantina. Estos son los únicos agentes aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (Manoharan et al., 2016). El tratamiento actual solo proporciona alivio sintomático al ofrecer una terapia paliativa temporal que disminuye la tasa de deterioro cognitivo asociado con la EA. La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se considera una de las principales estrategias terapéuticas que ofrece solo una creencia sintomática y un efecto modificador moderado de la enfermedad. La demostración del daño de las vías colinérgicas en el cerebro genera un gran interés en el desarrollo de fármacos. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa generalmente se utilizan para tratar la EA. Estos fármacos ayudan a mejorar las funciones cognitivas como la memoria y los pensamientos. Estos medicamentos son efectivos en pacientes con EA leve a moderada (Houghton y Howes, 2005; Akram & Nawaz 2017).

2.7 Tratamiento convencional

La EA todavía es incurable a pesar de ser una enfermedad conocida por el ser humano por más de cien años (Fang et al., 2013). El tratamiento actual solo ofrece alivio sintomático al proporcionar una terapia paliativa temporal que ralentiza el deterioro cognitivo asociado con la EA (Manoharan *et al.*, 2016). Como se mencionó, la inhibición de la acetilcolinesterasa sirve como estrategia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, además de la demencia senil, la ataxia, la miastenia grave y la enfermedad de Parkinson. El primer inhibidor de la acetilcolinesterasa aprobado específicamente para el tratamiento de la EA fue la tacrina (1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoacridina). Actualmente, varios inhibidores de la acetilcolinesterasa, como donepezil, galantamina y rivastigmina están disponibles para el tratamiento en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Manoharan *et al.*, 2016). La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se considera una de las principales estrategias terapéuticas que proporcionan efectos modificadores de la enfermedad sintomáticos y moderados. La memantina es un inhibidor del receptor de N-metil D-aspartato (NMDA), que se aplica en las etapas avanzadas de AD que puede combinarse con éxito con inhibidores de AChE (iAChE). Debido a sus acciones farmacológicas y su mecanismo de acción se han clasificado este grupo de fármacos anti Alzheimer como fármacos con efectos colinérgicos denominados

anticolinesterásicos y no colinérgicos denominados moduladores de la transmisión glutamatérgica (Davinelli et al., 2012; Manoharan *et al.*, 2016).

2.8 Agentes terapéuticos utilizados en AD.

La Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) ha aprobado cinco agentes terapéuticos (tacrina, donepezil, rivastigmina, galantamina y memantina) para mejorar la función cognitiva en la enfermedad de Alzheimer (EA) clasificados en dos tipos de medicaciones (Zhang *et al.*, 2020; Sahoo *et al.*, 2018):

1. Moduladores de la transmisión glutamatérgica denominados antagonistas de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA).
2. Anticolinesterásicos denominados inhibidores de la acetilcolinesterasa (iAChE).

2.8.1 Moduladores de la transmisión glutamatérgica:

Poseen efecto antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), el modo de acción de la memantina se opone a la actividad de glutamato al bloquear los receptores NMDA (tabla 2.3) (Sahoo *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020 y López 2015).

El nivel de aminoácido excitador se puede aumentar en el cerebro de pacientes con EA. La activación del receptor de NMDA es una característica importante para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en el mecanismo celular de aprendizaje y la memoria. Los receptores de NMDA tienen en una activación leve sostenida en el cerebro con EA, lo que lleva a la pérdida de LTP y deterioro de la función cognitiva, provocando toxicidad de aminoácidos excitadores, conllevando a la sobrecarga de calcio y la apoptosis (Zhang *et al.*, 2020). La memantina es un antagonista del receptor NMDA no selectivo, no competitivo, dependiente del voltaje y de afinidad media. Este fármaco está aprobado para la EA de grado moderado a severa. Existen estudios que avalan la eficacia de la memantina sola o combinada con un inhibidor de la colinesterasa para el tratamiento de la EA de grado moderada a severa. Los estudios que agregan memantina a los anticolinesterásicos para controlar los síntomas cognitivos o no cognitivos no son claros, se necesitan más información para demostrar el beneficio del agregado de memantina a los anticolinesterásicos (Porsteinsson *et al.*, 2008). Ésta actúa sobre la vía del glutamato implicada en los procesos de aprendizaje y memoria (neurotransmisión glutamatérgica en hipocampo) y en la neurodegeneración, ya que una actividad glutamatérgica excesiva tiene efectos neurotóxicos. Se inicia a dosis de 5 mg/día por una semana, incrementando progresivamente de a 5 mg semanales, en dos tomas, hasta lograr una dosis terapéutica de 20 mg/día (10 mg dos veces al día). Una vez alcanzada la

dosis de 20 mg/día, se puede recurrir al uso de comprimidos de 20 mg para administrar en una sola toma diaria con la misma eficacia. En general es bien tolerada, las reacciones adversas más frecuentes son la agitación y las alucinaciones (Gauthier *et al.*, 2008; López 2015).

2.8.2 Anticolinesterásicos.

Los fármacos tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina se clasifican como inhibidores de la colinesterasa y se están aprobados sus usos en la etapa leve a moderada en la demencia de la EA. Adicionalmente el donepezil también es recomendado para la EA severa o en etapa tardía (Tabla 2.3). Tacrina no se prescribe regularmente, debido a que ocasiona toxicidad en el hígado.

Tabla 2.3. Aspectos farmacológicos de los agentes utilizados en el tratamiento del Alzheimer: anticolinesterásicos (Donepezil, Rivastigmina y Galantamina) y Modulador de la transmisión glutamatérgica (Memantina). Tomado de López, 2015.

	Donepezil	Rivastigmina	Galantamina	Memantina
Clase química	Piperidina	Carbamato	Alcaloide fenantreno	Clorhidrato
Selectividad	Acetilcolinesterasa	Acetilcolinesterasa & butirilcolinesterasa	Acetilcolinesterasa receptor nicotínico	Glutamato
Mecanismo	Reversible, pseudoirreversible	Reversible, competitivo	Reversible, mixto no-competitivo	Bloqueo no competitivo de receptor NMDA
Metabolismo	Hepático	Periférico Renal	Hepático (75%) Renal (25%)	Renal
Vida media	70 horas	1-2 horas a 10 horas	7 a 8 horas	60 -100 horas
Dosis diaria	1	2	1 o 2	1 o 2
Presentación	Comprimidos Solución	Cápsulas Parches transdérmicos	Tabletas Capsulas de liberación lenta	Comprimidos Tabletas
Citocromo	CYP2D6,CYP3A4	Minima	CYP2D6,CYP3A4	No
Interacciones	Relajantes musculares, ketoconazol, quinidina, rifampicina, fenitoina, carbamacepina, alcohol	Relajantes musculares	Relajantes musculares, digoxina, β bloqueantes	Amantadina, ketamina, baclofeno, cimetidina, ranitidina, quinidina
Efectos secundarios	Nauseas, vomitos, diarrea, anorexia y pérdida de peso	Nauseas, vomitos, diarrea, anorexia y pérdida de peso	Nauseas, vomitos ,diarrea, anorexia y perdida de peso	Agitación, opsicosis
Contra indicaciones	Asma/ EPOC Bradicardia, enfermedad del seno Ulcus gastroduodenal activo, anestesia	Asma/ EPOC Bradicardia, enfermedad del seno Ulcus gastroduodenal activo, anestesia	Asma/ EPOC Bradicardia Ulcus gastroduodenal activo, anestesia	
Relación con los alimentos	Indiferente	Administrar con las comidas	Administrar con las comidas	

Como se ha señalado anteriormente, los iAChE son un grupo de fármacos con efectos colinérgicos que evitan la degradación de acetilcolina (ACh) (Figura 2.3) mediante la inhibición

de la enzima acetilcolinesterasa (Figuras 2.4 y 2.6) y actualmente constituyen la única estrategia farmacoterapéutica que de momento ha demostrado cierta eficacia en la disminución de la sintomatología en la EA (Sanabria et al., 2016). Para entender el mecanismo de acción de este grupo de fármacos y sus efectos terapéuticos es elemental revisar conceptos de la acetilcolina y la sinapsis colinérgica.

2.8.2.1 Acetilcolina y Sinapsis colinérgica

Neurotransmisor Acetilcolina:

La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor caracterizado tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, el cual participa en la regulación de diversas funciones como fenómenos de activación cortical, el paso de sueño a vigilia y procesos de memoria y asociación. La participación de la acetilcolina en multitud de funciones fisiológicas y su carácter de neurotransmisor en la unión neuromuscular han propiciado la aparición de una farmacología muy extensa, destinada a bloquear o incrementar la actividad colinérgica en la periferia, sin embargo, existen pocos fármacos con acción selectiva para los sistemas colinérgicos cerebrales (Sanabria 2017; Flores & Segura 2005).

Biosíntesis

La ACh se sintetiza a partir de la colina, que se acumula en las neuronas colinérgicas mediante una reacción con la acetilCoA y bajo la influencia enzimática de la colina acetiltransferasa (CAT). Existen mecanismos que regulan de manera precisa su síntesis y liberación (Figura 2.3). La CAT se localiza en el SNC, específicamente donde tiene lugar la síntesis de ACh. La mayor actividad de la CAT se encuentra en el núcleo interpeduncular, el núcleo caudado, la retina, el epitelio corneal, el hipocampo, la corteza cerebral y las raíces ventrales de la médula espinal; se sintetiza en el soma neuronal y viaja a lo largo del axón, posiblemente unida a los neurotúbulos, que actúan como transportadores; sin embargo, también se ha señalado la síntesis de esta proteína en los axones preterminales y botones terminales (Sanabria 2017; Flores & Segura 2005).

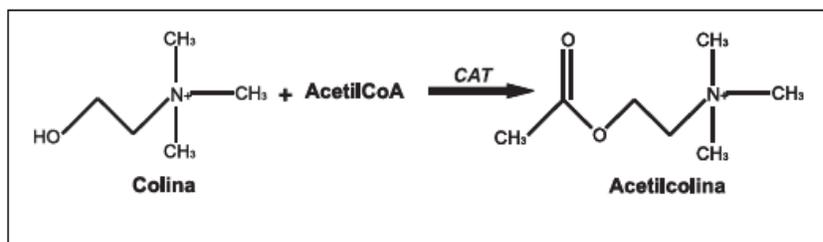


Fig 2.3. Biosíntesis de la Acetilcolina (ACh) mediante la acetilcolina transferasa (CAT)

Liberación

En las terminales colinérgicas el neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma, de donde puede ser liberado directamente al espacio sináptico, o bien, ser transportado al interior de las vesículas sinápticas para ser liberado por exocitosis. En este proceso, la acetilcolina contenida en vesículas es liberada al exterior al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica. La acetilcolina liberada al espacio sináptico actúa sobre sus receptores, o puede ser hidrolizada por acción de la acetilcolinesterasa. Lo anterior permite la inducción de cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica, que depende del tipo de receptor y de la forma en que éste se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción (Figura 2.4 y 2.5) (Flores y Segura 2005, Sanabria *et al.*, 2016 y 2017).

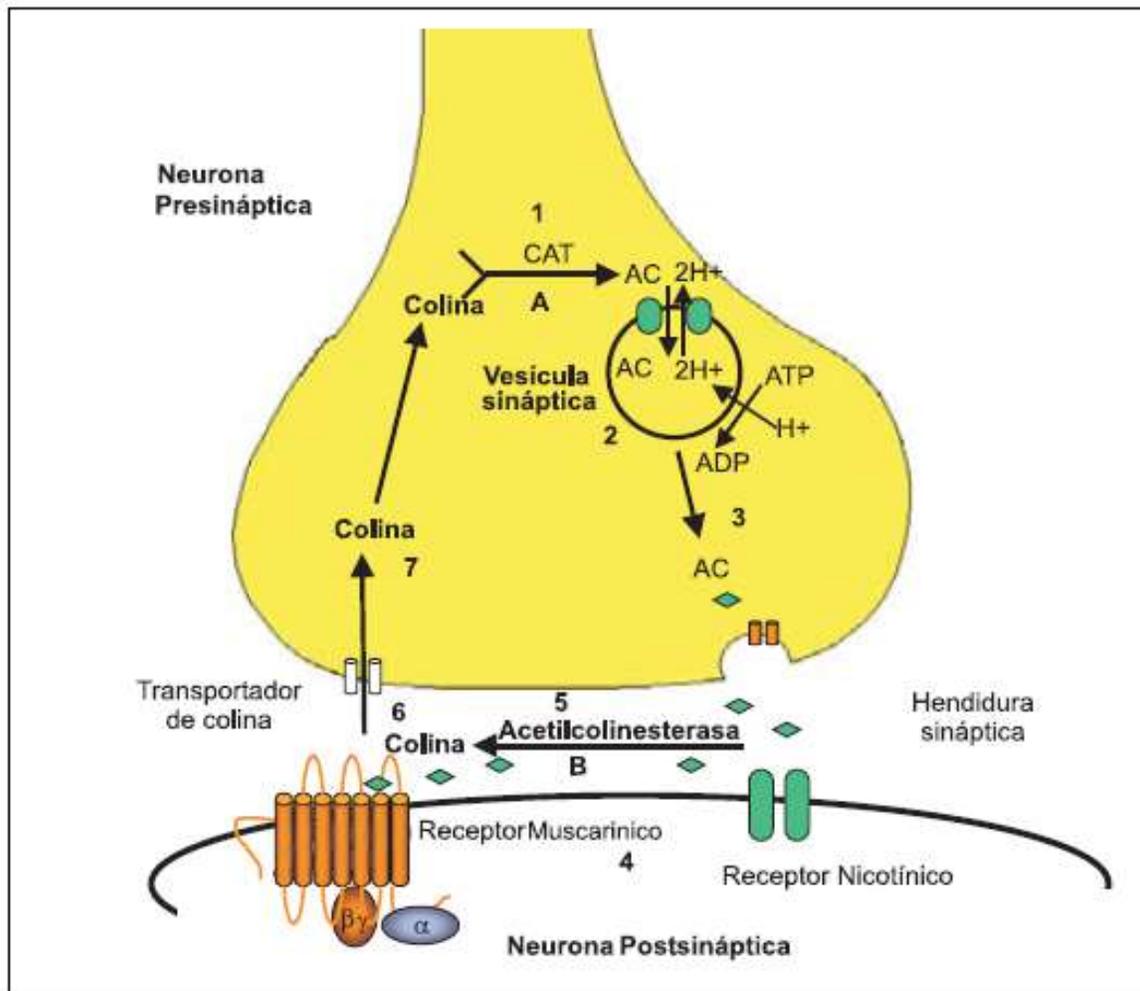


Fig 2.4. Sinapsis colinérgica; biosíntesis mediante la CAT (acetilcolintransferasa) y degradación por la AChE (acetilcolinesterasa)

Receptores de Acetilcolina

Los receptores de membrana colinérgicos (Figura 2.4 y 2.5), su función principal es la transducción de señales, pueden dividirse en dos tipos:

1. Los receptores ionotrópicos que permiten la apertura de canales iónicos, como los nicotínicos (rN) para ACh, GABAA y los de glicina, que poseen un sitio de unión para el neurotransmisor y contiene el canal iónico responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula.
2. Un segundo tipo de receptor metabotrópico que interactúa con proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteína G), como los colinérgicos de tipo muscarínico (rM) (Flores y Segura 2005, Sanabria *et al.*, 2016 y 2017).

subunidades del receptor a acetilcolina, de tipo muscarínico.

ESPECIE	M1	M2	M3	M4	M5
Humano (Aminoácidos)	460	466	590	479	532
Distribución	Corteza cerebral, ganglios basales, tubérculo olfativo, cerebro medio e hipocampo.	Cerebro, tronco del encéfalo, hipocampo, cerebro medio, tubérculo olfativo, corazón y músculo liso.	Hipocampo, corteza cerebral estriado y estructuras talámicas.	Estriado, tubérculo olfativo, corteza cerebral hipocampo y pulmón.	Cuerpo estriado, hipocampo y corteza cerebral.

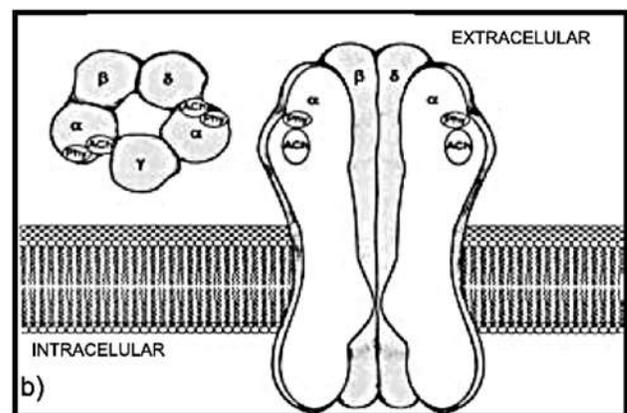
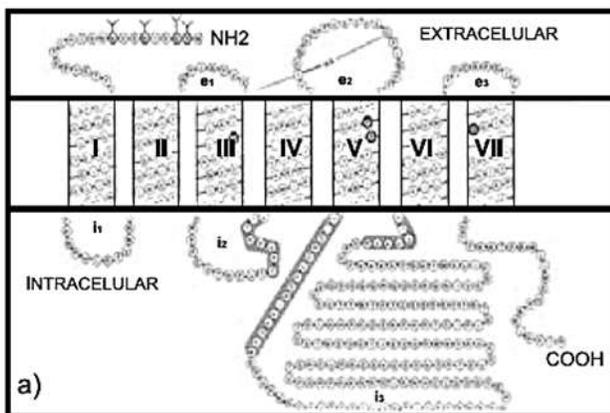


Figura 2.5. Estructura de los receptores de acetilcolina. a) Se esquematiza la estructura del receptor de tipo muscarínico. I-VII, dominios transmembranales. i1, i2, i3; asas citoplasmáticas; e1, e2, e3; asas extracelulares. NH2, extremo amino terminal; COOH, extremo carboxilo terminal y nicotínico. b) Este tipo de receptores contienen dos subunidades del tipo a) y el resto del tipo b, d y g y varios sitios de unión a agonistas y antagonistas selectivos (Tomado de Flores y Segura, 2005).

Degradación de la acetilcolina

El papel principal de AChE es la degradación de la acetilcolina (Figura 2.6) y por lo tanto la terminación de la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis colinérgicas por hidrólisis rápida del neurotransmisor de acetilcolina. Su inhibición refuerza la neurotransmisión colinérgica que opera a una velocidad cercana al límite de difusión en la asociación y disociación del sustrato. Por esta razón, la AChE ha sido el objetivo de muchos compuestos que van desde agentes nerviosos organofosforados e insecticidas hasta medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y la recuperación del bloqueo neuromuscular en cirugía. Como inhibidor de AChE en uso clínico, Huperzina A ha atraído considerable interés debido a su menor toxicidad, mayor selectividad e inhibición a largo plazo. (Rydzewski et al., 2018)

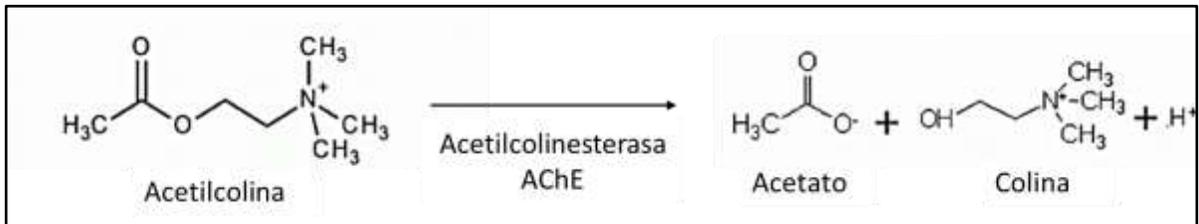


Fig 2.6. Degradación de la Acetilcolina (ACh) mediante la acetilcolinesterasa (AChE)

Existen diversas funciones cerebrales en las que la acetilcolina y sus receptores tienen una función reguladora. Esta función se ve ejemplificada de manera significativa por algunos procesos patológicos, relacionados con alteraciones en la transmisión colinérgica, principalmente en enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer. (Flores y Segura 2005, Sanabria *et al.*, 2016 y 2017).

Acetilcolinesterasa (AChE)

La familia colinesterasa consiste principalmente en dos enzimas; acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE). AChE puede catalizar la hidrólisis del neurotransmisor llamado "acetilcolina" (ACh) en colina y ácido acético, mientras que BuChE (pseudocolinesterasa) puede funcionar de la misma manera que AChE, diferenciándose solo hidrolizando otro neurotransmisor "butirilcolina" (BuCh) en lugar de ACh. La acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) son importantes en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA), explicada por "hipótesis colinérgica". La acetilcolinesterasa degrada la acetilcolina lo que conduce a una deficiencia de este neurotransmisor algo que es característico en los cerebros de pacientes con EA. En consecuencia, la inhibición de la acetilcolinesterasa se ha convertido

en una de las estrategias de tratamiento más recetadas para la EA. Adicionalmente, los inhibidores de la colinesterasa también han sido reportados por su efectividad en algunas otras enfermedades como miastenia grave, glaucoma y el síndrome de Down. Todas estas aplicaciones pueden convertirlas en una clase de fármacos de objetivos múltiples, poniendo un énfasis especial en la terapia contra la EA en primer lugar.

2.8.3 Inhibidores de la AChE y la hipótesis colinérgica de la EA

Como se ha revisado, durante la neurotransmisión, la acetilcolina (ACh) es liberada de las ataduras nerviosas presinápticas al receptor correspondiente. En la membrana postsináptica la acetilcolina se hidroliza a acetato y colina mediante acetilcolinesterasa para terminar el relevo de la neurotransmisión (Tun y Herzon 2012). La hipótesis colinérgica, como una de las teorías importantes en la patogénesis de la EA, sugiere que la disfunción y la degeneración de las neuronas que contienen acetilcolina en el cerebro contribuyen sustancialmente a la pérdida de memoria y la orientación, las alteraciones del comportamiento, y la personalidad anormal observada en aquellos pacientes con AD (Zhang *et al.*, 2020). Desde el año 2006 no han surgido nuevos fármacos aprobados a nivel mundial y en la actualidad existen varios fármacos en fase de desarrollo. Hace varias décadas que se demostró una correlación directa entre el déficit colinérgico cerebral y el deterioro cognitivo y desde entonces surge la utilización de fármacos potenciadores de la función colinérgica como inhibidores de la acetilcolinesterasa (tabla 2.3) (Zhang *et al.*, 2020; Budson & Solomon 2015).

2.8.4 Mecanismo de acción de los Anticolinesterásicos

El mecanismo de acción de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (anticolinesterásicos) es evitar la degradación de la ACh (Figura 2.7). Actualmente constituyen la única estrategia farmacoterapéutica que de momento ha demostrado cierta eficacia en la disminución de la sintomatología en la EA (Sanabria *et al.*, 2016). A su vez, la efectividad de los inhibidores de la acetilcolinesterasa disminuye a medida que progresa la enfermedad debido a que su efecto depende del estado funcional de las terminaciones nerviosas, las cuales se degeneran a medida que la enfermedad progresa; estos fármacos inhiben de forma reversible la acetilcolinesterasa cerebral evitando la degradación del neurotransmisor y favoreciendo una elevación de los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica. La inhibición que producen estos agentes es relativamente inespecífica ya que no solo actúan sobre la acetilcolinesterasa cerebral sino también sobre otras colinesterasas como la butirilcolinesterasa (Tun y Herzon 2012). La elevación sináptica de la ACh conlleva un aumento en los efectos no selectivos del

neurotransmisor que se ven reflejados tanto a nivel nicotínico como muscarínico (Figura 2.5); contribuyendo a la presencia de efectos adversos no deseados relacionados con la estimulación de los receptores muscarínicos M2 y M4, y la consecuente generación del péptido beta amiloide (A β). En términos generales podemos decir que actualmente los inhibidores de acetilcolinesterasa constituyen los principales medicamentos disponibles para el tratamiento de la EA, y proporcionan una mejoría modesta y transitoria de la sintomatología, así como mejoras cognitivas en un 5% de los pacientes (Sanabria et al., 2016; Budson & Solomon 2015).

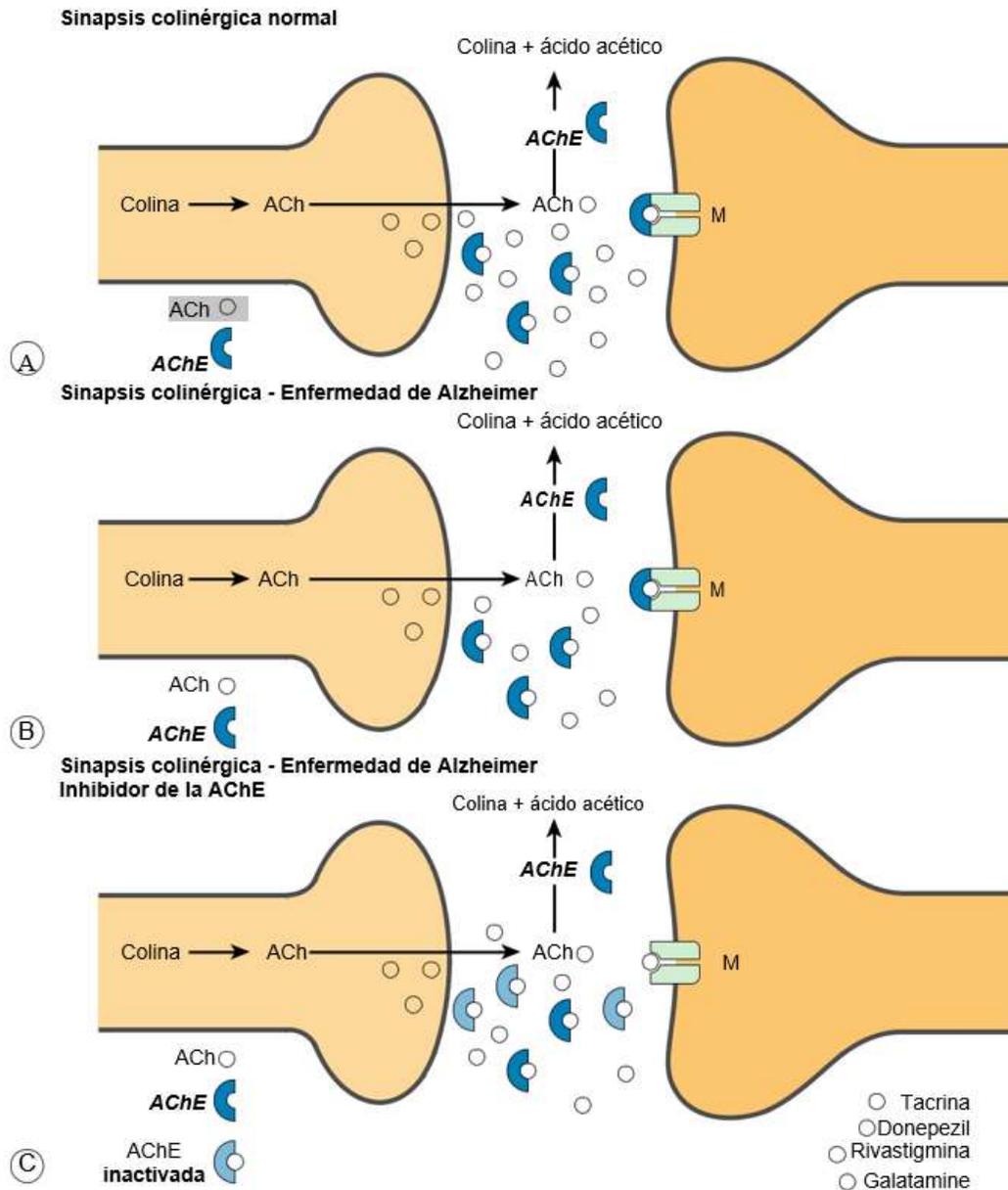


Figura 2.7 Mecanismo de acción de los iAChE. A) Sinapsis colinérgica normal en receptor muscarínico (M); B) Sinapsis colinérgica en AD; C) iAChE, tacrina, donepezil, rivastigmina y galatamina (tomado de Budson & Solomon 2015).

2.8.5 Clasificación de los Anticolinesterásicos

Los agentes promotores de la acetilcolina se han convertido en una estrategia importante para la terapia AD. Los fármacos anticolinesterásicos clasificados en la primera generación se encuentran la fisostigmina, tetrahidroaminoacridina, y tacrina. Estos agentes no se han utilizado para el tratamiento a largo plazo de la EA debido a su mal eficacia, corta duración, y los efectos secundarios graves (Zhang *et al.*, 2020). Para el caso de la tacrina, la escasa evidencia de eficacia clínica junto con las características farmacológicas de este fármaco (vida media: 2-4 h), que hacen que se tenga que administrar en forma de cuatro dosis al día, y junto con un grave problema de hepatotoxicidad que se ha observado en un alto porcentaje de los pacientes tratados (20%) ha llevado a su retirada progresiva (Gandía *et al.*, 2006). La segunda generación de inhibidores de la acetilcolinesterasa tales como donepezil, rivastigmina, galantamina y huperzina A (detallada en la sección 2.9), actualmente se han utilizado como tratamiento de primera línea en la EA. Los estudios clínicos han confirmado que la segunda generación de inhibidores de la colinesterasa puede mejorar la función de la memoria y la calidad de vida en pacientes con EA con menos efectos secundarios después de su uso a largo plazo (Zhang *et al.*, 2020)

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la demencia recomendados son: **donepezil, galantamina y rivastigmina**. Estos fármacos, al inhibir la acetilcolinesterasa (AChE), aumentan la disponibilidad de acetilcolina en el cerebro. La galantamina, además, tiene una acción agonista nicotínico presináptico y rivastigmina inhibe a la butirilcolinesterasa (BuChE). (López 2015).

Donepezil está aprobado para la EA leve a severa. Es un inhibidor selectivo y reversible de la acetilcolinesterasa, con mucha menor afinidad por la butirilcolinesterasa, de posología cómoda, por su mayor vida media plasmática (70 horas, alcanzando el estado de equilibrio en aproximadamente 3 semanas tras el inicio del tratamiento) y carente de efecto hepatotóxico. Se une a proteínas plasmáticas en un 95% y se metaboliza por vía renal y hepática. Se inicia a dosis de 5 mg/día, titulando a 10 mg luego de un mes (López 2015). Se demostró una dosis de donepezil en ensayos clínicos de 5-10 mg/día, usando 10 mg/día, y la dosis máxima era 23 mg/día. El tiempo de observación para la eficacia en estos ensayos fue en su mayoría de 24 semanas, el más corto fue de 12 semanas y el más largo fue de hasta 254 semanas (4.9 años) (Zhang *et al.*, 2020).

Galantamina, aprobado para EA de leve a severa, actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa de forma selectiva, competitiva y reversible, y también mediante modulación alostérica de los receptores nicotínicos, aumentando la actividad de la acetilcolina sobre estos receptores, a partir de ciertas concentraciones (López 2015). Regula el receptor nicotínico de transición alostérico en la membrana presináptica, reduce la reabsorción de la acetilcolina, y aumenta el nivel de acetilcolina en la hendidura sináptica (Zhang et al., 2020). Además, produce un aumento de la densidad de unión a los receptores nicotínicos de la corteza e hipocampo. Se debe iniciar con dosis de 2 a 4 mg/día. Al mes de iniciado el tratamiento y en las presentaciones que no son de liberación prolongada, titular con 4 mg 2 veces por día, aumentando progresivamente, mes a mes, a 8 mg 2 veces por día hasta llegar a 12 mg cada 12 hs, siendo éste el objetivo terapéutico (López 2015). La galantamina tiene preparación oral y parenteral, pero por lo general se administra por vía oral para el tratamiento de EA. La vía parenteral de galantamina se utilizan principalmente para el tratamiento de la miastenia grave (Zhang et al., 2020).

Rivastigmina, aprobada para EA de leve a moderada, es un inhibidor pseudoreversible de la AChE y BuChE, con acción selectiva en hipocampo y la corteza. Inhibe la acetilcolinesterasa cuatro veces más en el sistema nervioso central que en los tejidos periféricos, actuando fundamentalmente sobre la forma G1 que, además, es la predominante en el cerebro de pacientes con EA. Se absorbe rápidamente por vía oral, preferentemente sin consumo de los alimentos, presenta una débil unión a las proteínas plasmáticas (40%) por lo que presenta escasa interacción con fármacos con afinidad proteica. Además, el metabolismo hepático es mínimo, lo que incrementa su perfil favorable. Su principal vía de eliminación es la renal. Al igual que donepezil no debe asociarse a fármacos tipo succinilcolina durante la anestesia por el riesgo de aumentar la relajación muscular. La inhibición dual de AChE y BuChE puede resultar de mayor utilidad cuando se encuentran asociados determinados síntomas como apatía, déficits atencionales y trastornos conductuales. Se debe iniciar a dosis de 1.5 mg dos veces al día, titulando 1.5 mg más por dosis cada 15 días, hasta llegar a 6 mg cada 12 h. Preparaciones de rivastigmina incluyen tanto las cápsulas y parches transdérmicos. Actualmente se dispone de parches transdérmicos de 5 y 10 cm² equivalentes a 9 y 18 mg del principio activo con una tasa de liberación *in vivo* de 4.6 y 9.5 mg/día, respectivamente. Se debe iniciar con el parche de 5 cm² y cambiar al mes, al parche de 10 cm² (López 2015). El parche transdérmico de rivastigmina aumenta el cumplimiento de los pacientes y también

reduce las reacciones adversas en cierta medida. El parche transdérmico tiene el mismo efecto y menos reacciones gastrointestinales (7.2% y 23.1%, respectivamente) en comparación con 12 mg cápsula. De manera similar a otros inhibidores de la acetilcolinesterasa la rivastigmina puede causar diarrea, náuseas, vómitos, pérdida de apetito, mareos y otras reacciones adversas, con vómitos los más comunes. Adicionalmente los parches transdérmicos también puede causar reacciones alérgicas en la piel tópica, pero la incidencia es baja (Zhang *et al.*, 2020).

2.8.6 Efectos adversos de los iAChE's

Si bien en la mayoría de los casos de estos fármacos son bien toleradas es necesario la titulación de la dosis de las drogas anticolinesterásicas, para detectar la aparición de efectos adversos. Estos efectos son: náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, pérdida del apetito, pérdida de peso, insomnio, síncope y bradicardia. Por su efecto colinomimético pueden exacerbar o inducir síntomas extrapiramidales. Cualquiera de los tres fármacos puede utilizarse para el tratamiento de la EA en etapa leve a moderada; sólo donepezil y galantamina fueron aprobadas también para la EA severa. La selección de la droga a utilizar dependerá entonces, no sólo de la etapa de la EA sino también de la preferencia del paciente y cuidador, de la disponibilidad del fármaco y de la aparición e intensidad de efectos adversos y de reacciones medicamentosas. En este sentido, la aparición de reacciones adversas, no inhabilita su sustitución por otro anticolinesterásico (Zhang *et al.*, 2020; Budson & Solomon 2015).

2.8.7 Eficacia de los iAChE's

En la evaluación de la efectividad de estos fármacos, se consideran los cambios en la cognición, en las actividades de la vida diaria (función) y en los trastornos conductuales. La mayoría de los estudios clínicos con inhibidores de la acetilcolinesterasa han demostrado una eficacia en mejorar el estatus cognitivo y en la función (discapacidad) en sujetos con EA de grado leve a moderado. Con respecto a los síntomas conductuales, se ha demostrado la eficacia en algunos de ellos, sobretodo en la agitación, apatía y psicosis (Zhang *et al.*, 2020; Budson & Solomon 2015; López 2015).

2.9 Recomendaciones en el tratamiento farmacológico en el EA

En los pacientes con EA el tratamiento con drogas anticolinesterásicas el donepezil galantamina y rivastigmina debe considerarse desde el momento que se realiza el diagnóstico,

teniendo en cuenta los beneficios terapéuticos esperados y los potenciales problemas de seguridad (Recomendación A). Los beneficios sobre los síntomas cognitivos y no cognitivos han sido demostrados en aquellos con enfermedad leve moderada y severa (Recomendación A) (Zhang *et al.*, 2020; López 2015).

Recomendación para los tratamientos en la EA (Tabla 2.4):

- Anticolinesterásicos
- Memantina
- Combinación anticolinesterásicos-memantina
- No indicar *Ginkgo biloba*, vitamina E, AINES, estatinas y otros.

Tabla 2.4. Esquema terapéutico según severidad de la EA

EA leve	EA moderada	EA severa
Donepecilo Galantamina Rivastigmina	Donepecilo Galantamina Rivastigmina + Memantina	Donepecilo Galantamina + Memantina

Varios inhibidores de acetilcolinesterasas con orígenes sintéticos y naturales están disponibles en el mercado; sin embargo, las razones que incluyen efectos secundarios y la biodisponibilidad relativamente baja limitan sus usos en la medicina y todavía existe una gran demanda para descubrir nuevos anticolinesterásicos. Por esta razón es importante descubrir novedosas fuentes de agentes terapéuticos para el tratamiento del Alzheimer.

2.10 Otros Agentes Terapéuticos

En resumen, los tratamientos disponibles para abordar la demencia degenerativa primaria buscan: aumentar la concentración colinérgica a nivel sináptico, prevenir la excitotoxicosis por glutamato, contrarrestar el estrés (figura 2.8). Actualmente existen fármacos que se usan para el tratamiento de la EA, la mayoría no están aprobados por la FDA y muy pocos si lo están, también existe un grupo grande que se encuentra en fase experimental de investigación. Dentro de este último grupo incluyen la terapia con antioxidantes, *Ginkgo biloba* y vitaminas, la terapia con células madre, la terapia hormonal, el uso de medicamentos antihipertensivos o hipolipemiantes y los inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa (PDE), la inhibición de la β -secretasa y la γ -secretasa, inhibidores de la agregación de A β , inhibición de

Hiperfosforilación de Tau y NFT intracelular, uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), quelantes de metales de transición, fármacos de resistencia a la insulina, etanercept, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Hasta la fecha ninguna de estas sustancias con efectos antioxidantes, neuroprotectores y/o nootrópicos ha demostrado beneficios significativos en el tratamiento de la EA (Akram & Nawaz 2017; Sanabria et al., 2016).

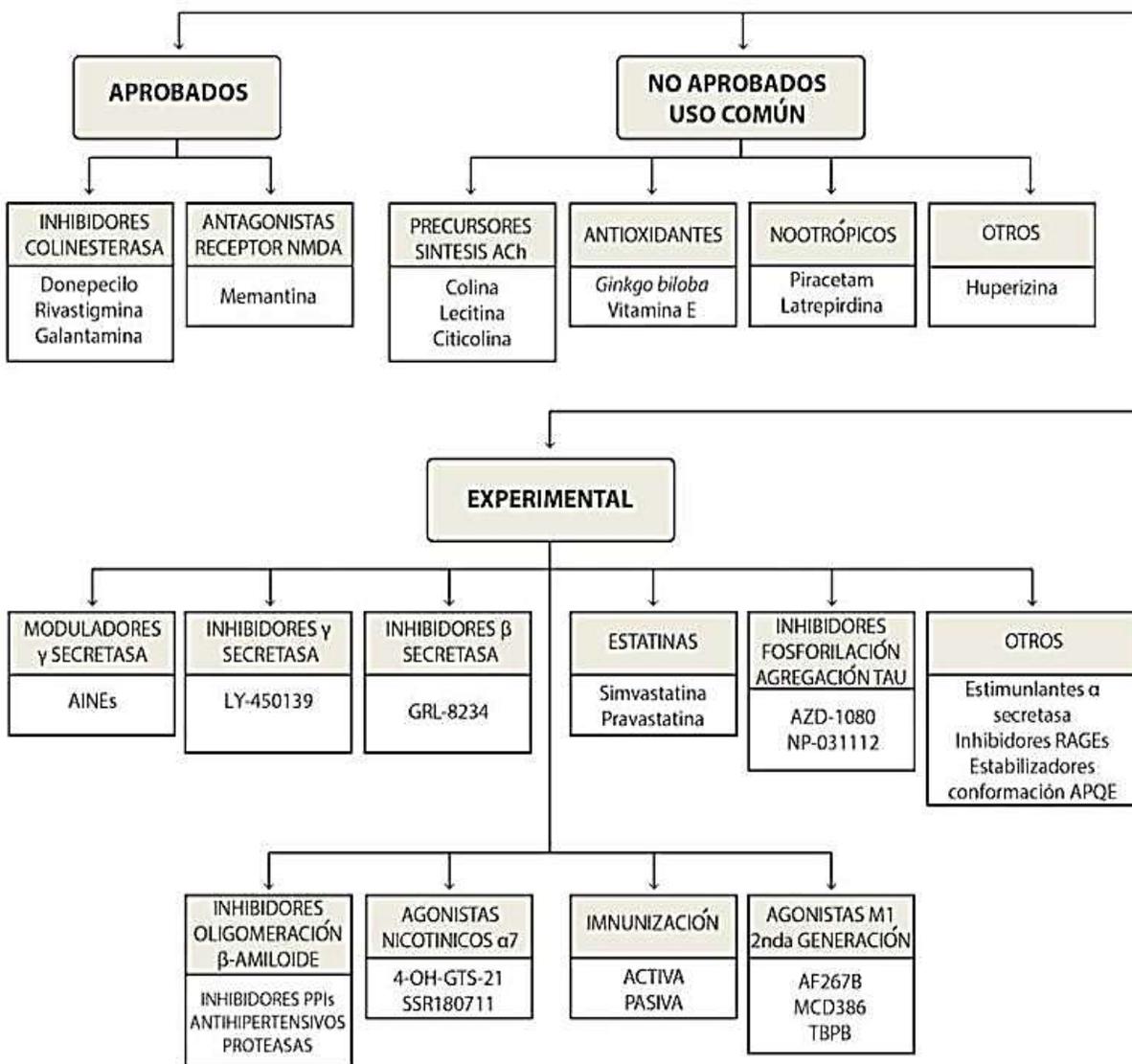


Figura 2.8. Principales fármacos utilizados y en investigación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Fármacos denominados como “aprobados” según los lineamientos de la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EEUU. La cual establece el uso de inhibidores de la colinesterasa en casos leves a moderados y la utilización de antagonistas del receptor NMDA de glutamato para casos moderados a severos. ACh: acetilcolina, AINEs: analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, RAGEs: receptores de productos avanzados de glicación, APOE: apolipoproteína E, PPIs: interacciones proteína–proteína, M1: receptores muscarínicos de acetilcolina subtipo M1 (tomado de Sanabria *et al.*, 2016).

2.11 Plantas medicinales en el tratamiento de la EA

2.12 Papel de la etnobotánica

Muchos medicamentos se basan en las adaptaciones sintetizadas de compuestos naturales que se encuentran en las plantas. En los últimos años, el interés en la medicina a base de hierbas ha aumentado, lo que lleva a un mayor interés científico en el uso medicinal de las plantas para tratar enfermedades y mejorar la salud, a menudo con menores efectos secundarios significativos. Las hierbas medicinales y los productos naturales son los remedios más antiguos conocidos por la humanidad. Las plantas medicinales han sido utilizadas por todas las culturas a lo largo de la historia. En el escenario actual, la demanda de productos herbales está creciendo exponencialmente en todo el mundo (Hasegawa, 2016; Akram & Nawaz 2017).

La etnobotánica es el estudio de las plantas utilizadas por los seres humanos como parte de su cultura. Toda sociedad humana hace un amplio uso de plantas y sus productos derivados para una amplia gama de propósitos, incluida la medicina. El estudio de las plantas utilizadas para la medicina es una parte importante de la disciplina conocida como *etnofarmacología*, un término acuñado en la década de 1960, en el que la investigación y el interés se han desarrollado considerablemente en los últimos cuarenta años. La etnofarmacología como ciencia abarca estudios bioquímicos, farmacológicos o clínicos para dilucidar cualquier actividad que pueda apoyar el uso tradicional, además de describir los usos tradicionales de las plantas para tratar enfermedades. Esto a veces se acompaña de investigaciones químicas para determinar la naturaleza de cualquier compuesto activo en el material que se está estudiando (Howes & Houghton 2012).

Además de varias revistas científicas que se especializan en trabajos de investigación sobre este tema, en los últimos años se han escrito muchas reseñas y capítulos de libros (Howes & Houghton 2012). La etnobotánica, siendo popular en China y en el Lejano Oriente y posiblemente menos enfatizada en Europa, desempeña un papel importante en el descubrimiento de agentes anti-EA a partir de productos botánicos. Las plantas medicinales chinas se han utilizado tradicionalmente en el tratamiento de la EA. Ayurveda ha contribuido en el descubrimiento de fármacos y muchos de estos también están siendo investigados clínicamente. Una serie de plantas medicinales, ya sea en forma cruda o como compuestos aislados, se han exhibido para reducir las características patológicas asociadas con la EA (Akram & Nawaz 2017). Sin embargo, en la literatura europea, las plantas como *Salvia*

officinalis, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, entre otras, fueron citadas por sus acciones colinérgicas y sus propiedades de mejora de la memoria. Según los informes, la psicofarmacología de la medicación europea a base de hierbas para mejorar la cognición estuvo mediada por actividades antioxidantes, antiinflamatorias, estrogénicas e inhibitoras de la BuChE y AChE (Howes & Houghton 2012). Adicionalmente a la medicina ayurvédica (Medicina Tradicional de la India) y la china, se sabe que la medicina europea y japonesa ejercen propiedades procognitivas y antidemenciales al inducir la eficacia colinérgica del sistema nervioso central (SNC). Además de la EA, se encontró que las plantas y los extractos de plantas protegen contra la enfermedad de Parkinson (EP) (Dey y De, 2015), la enfermedad de Huntington (HD) el trastorno por déficit de atención / hiperactividad (TDAH) (Pellow et al., 2011), esclerosis múltiple (EM), esquizofrenia (Ahmed y Kabidul Azam, 2014), accidente cerebrovascular, catalepsia etc. El mecanismo molecular subyacente de la neuroprotección exhibido por los compuestos naturales depende de su capacidad para influir en varias vías de señalización vinculadas con el plegamiento de proteínas y la neuroinflamación (Essa et al., 2012). Howes & Houghton en el 2012 hacen una revisión donde presentan una lista de plantas medicinales anti-AD con sus nombres científicos, familias de plantas, partes usadas, extracto activo / fracción usada, eficacia anti-EA exhibida en modelos neurotóxicos *in vitro* y / o *in vivo* / ensayos y mecanismos de acción humanos (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Fitoquímicos y derivados con Efectos farmacológicos y clínicos relevantes para la enfermedad de Alzheimer tomado de Howes & Houghton 2012.

Fitoquímico (y Derivativo)	Plant Fuente *	Uso etnobotánico de la planta	Efectos farmacológicos	Observaciones y efectos clínicos en seres humanos	Conclusiones
Cannabidiol (CBD) y nabilona derivado sintético	Canabis <i>Cannabis sativa</i> L. (Cannabaceae) Partes aéreas	Descrito por hindúes y chinos trabajos sobre medicina; una de las drogas psicotrópicas más antiguos conocidos; fechas de negocio Volver a 4000 aC en China	Acciones mecanicista de CDB incluyen actividad antioxidante, neuroprotección contra A β y la inhibición de la hiperfosforilación de tau estimulado las células neuronales; también anti-psicótica y ansiolítica	CDB reduce la psicosis en pacientes normales y PD; nabilona mejora los síntomas de la ansiedad en pacientes comparados con placebo Faltan pruebas concluyentes para la eficacia de los cannabinoides para la psicosis en la demencia en los ECA ciego	CDB produce efectos mecanicistas y se muestra prometedor para la eficacia en BPSD, pero son necesarios más ECA para determinar la eficacia de CDB y otros cannabinoides (incluyendo derivados sintéticos)

Curcumina	<p>Cúrcuma</p> <p><i>Curcuma longa</i> L.</p> <p>(Zingiberaceae)</p> <p>Rizoma</p>	<p>Se utiliza en Ayurveda como un rejuvenecedor para ralentizar el proceso de envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. También se indica para la manía de acuerdo a la Farmacopoea de la Republica Popular China</p>	<p>Efectos mecanísticos incluyen antioxidantes, anti-inflamatorias, neuroprotección contra EA. Previene y trata los deterioros cognitivos <i>in vivo</i> incluyendo en un modelo animal de demencia</p>	<p>Mejora la función cognitiva y se ha encontrado menor prevalencia de EA en las poblaciones que consumen de curry; indicativo de prevención contra la demencia un efecto protector en el deterioro cognitivo. En pacientes con EA no se observó en un estudio doble ciego 6 meses RCT</p>	<p>Los datos epidemiológicos sugieren la curcumina puede ser más relevante para la prevención en lugar de tratamiento de la demencia; más largo plazo se necesitan ECA para determinar la eficacia para la cognición (en la demencia y el deterioro cognitivo leve (DCL))</p>
Huperzina A	<p>lycopodium</p> <p><i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis.</p> <p>(Lycopodiaceae)</p>	<p>Desde hace 1000 años en China e utiliza para las varias dolencias incluyendo a promover la circulación de la sangre; prescripción como preparado la 'Qian Ceng ta' es utilizado para aliviar la pérdida de memoria</p>	<p>Principal modo de acción es la inhibición de la AChE acción neurotrófica y neuro-protector contra el Aβ, el estrés oxidativo y glutamato [24] Mejora la función cognitiva <i>in vivo</i></p>	<p>La eficacia clínica (mejorado puntuaciones del MMSE ** y actividades de la vida diaria) que se muestran en los ECA en pacientes con EA; ensayos han alcanzado la fase II. Una revisión Cochrane evaluó seis ensayos con sólo uno de buena calidad; se concluyó que la huperzina A parece mejorar la función cognitiva general, el estado clínico global, alteración del comportamiento y el rendimiento funcional en la EA, con pocos efectos adversos</p>	<p>Muchos RCT indican eficacia en EA con efectos adversos limitados reportados, este último también un factor importante es que los iAChE's para la EA produce efectos adversos particularmente GI; Sin embargo, los problemas con los métodos de ECA significan que se requieren datos más importantes y fiables de ECA</p>
<p>Magnolol (M)</p> <p>Honokiol (H)</p> <p>4-O-metil-honokiol (4-MH)</p>	<p><i>Magnolia officinalis</i> Rehder y E.H. Wilson</p> <p>(Magnoliaceae)</p> <p>Bark</p>	<p>Se utiliza en la medicina tradicional china y se considera un remedio para la ansiedad y trastornos nerviosos</p>	<p>M, H y 4-MH inhibe AChE; son neuroprotectores contra la toxicidad Aβ <i>in vitro</i>; 4-MH también <i>in vivo</i></p> <p>M, H y 4-MH inhiben el deterioro de la memoria <i>in vivo</i>; H y M prevenir déficits colinérgicos <i>in vivo</i>, H y 4-MH son anti-inflamatorios (incluyendo vía de la inhibición de la proteína quinasa C y la ruta de NF-κB).</p> <p>4-MH inhibe β secretasa y fibrilización <i>in vitro</i></p> <p>4-MH inhibe efectos neurotóxicos de NMDA <i>in vivo</i>.</p> <p>mejora los comportamientos del sueño <i>in vivo</i> posiblemente a través de mecanismos gabaérgicos.</p>	<p>Faltan datos clínicos para lignanos (M, H y 4-MH) o extractos estandarizados. Un estudio piloto doble ciego controlado con placebo sugirió una combinación de M. <i>officinalis</i> y <i>Rupr amhelense</i> de <i>Phellodendron</i> pueden aliviar los síntomas de ansiedad transitoria leve en mujeres premenopáusicas</p>	<p>Aunque se informó de numerosos efectos mecanísticos para M, H y 4-MH relevante para la patología EA y Cognición, y puede ser relevantes para BPSD, hay una relativa falta de evidencia de la eficacia clínica en EA; efectos mecanísticos parecen justificar la investigación de estos lignanos en DCL o EA</p>

Fitoquímico (y Derivativo)	Plant Fuente *	El uso etnobotánico	Efectos farmacológicos	Las observaciones y los efectos clínicos en seres	Conclusiones
fisostigmina (Y derivados sintéticos Rivas-tigmine)	frijol Calabar <i>Physostigma venenosum Balf.</i> (Leguminosae) semillas	Tradicionalmente utilizado en África, particularmente el sureste de Nigeria, por las muertes rituales asociados con el funeral de un jefe, y como un veneno prueba para evaluar la culpabilidad de los presuntos Criminales	La fisostigmina mejora la Cognición <i>in vivo</i> El modo de acción principal de la fisostigmina y numerosos derivados sintéticos es la inhibición AChE	La evidencia limitada para la eficacia de la fisostigmina en EA La rivastigmina analógica es eficaz para el tratamiento sintomático de la EA y es un fármaco autorizado para este propósito	Aunque los derivados de fisostigmina y numerosos sintéticos se han explorado para potencial terapéutico en EA, sólo el análogo sintético de rivastigmina ha demostrado eficacia clínica en EA
vincamina y (Derivado sintético vinpocetina)	vinca menor <i>Vinca minor L.</i> (Apocynaceae) Partes aéreas	Se utiliza para los trastornos cerebrales y la memoria en la medicina popular europea [41]	Vincamina aumenta el flujo sanguíneo cerebral, bloquea canales de voltaje Na ⁺ y mejora la memoria La vinpocetina es neuroprotector frente a la toxicidad inducida por NMDA y mejora la memoria en un modelo animal de EA	Vinpocetina mejora la función cognitiva en pacientes con demencia en ECA doble ciego; datos son más prometedores para la demencia vascular en lugar de EA Cochrane describe pruebas insuficientes para apoyar el uso de vinpocetine para tratar la demencia	Los alcaloides de la vinca parecen mejorar las funciones cognitivas en la demencia, aunque se necesitan ECA adicionales para confirmar la falta general de las pruebas y la relevancia para la EA; otros tratamientos (sobre todo iACHE) muestran beneficios más favorables y los los ECA adicionales para los alcaloides de la vinca no están justificados en la actualidad.

Ensayo Controlado Aleatorio (ECA); Síntomas Fisiológicos de la Demencia (BPSD); MMSE:Test Mini Examen del Estado Mental; Deterioro cognitivo leve (DCL)

La mayoría de estos estudios etnobotánicos están dirigidos principalmente a buscar evidencia científica para explicar el uso tradicional de la planta, o al descubrimiento de nuevos compuestos que podrían proporcionar 'moléculas blanco' para nuevos medicamentos que se agregarán al repertorio terapéutico, especialmente para enfermedades donde el tratamiento no es muy satisfactorio. El primer enfoque es más común en los círculos académicos, mientras que el segundo es más empleado por la industria farmacéutica. (Howes & Houghton 2012; Akram & Nawaz 2017).

Las relevantes propiedades medicinales de las plantas se han documentado durante siglos en diferentes culturas, y hay muchas especies de plantas que se han utilizado tradicionalmente para los trastornos de la memoria, que ahora se están explorando para determinar cualquier base científica para sus destacados usos. Las plantas han sido una fuente valiosa de fármacos, y los fitoquímicos también han proporcionado plantillas para desarrollar drogas sintéticas (por ejemplo, rivastigmina, basada en la estructura química de la fisostigmina de *Physostigma venenosum*). Aunque el desarrollo de fármacos de origen botánico es un blanco, el uso de plantas como hierbas medicinales sigue siendo popular. Se han explorado pruebas científicas de eficacia y seguridad para muchas especies, aunque se necesita más investigación, particularmente para identificar fitoquímicos activos para producir productos herbales estandarizados. Como se ha descrito anteriormente, para la enfermedad de Alzheimer (EA) hay pocos medicamentos disponibles para tratar los síntomas, y faltan terapias exitosas que modulan la progresión de la enfermedad. Dado que dos de los medicamentos actualmente autorizados para la EA se basan en productos naturales (galantamina y rivastigmina), no es sorprendente que muchas plantas estén siendo investigadas como una fuente potencial de nuevas terapias para la EA (Howes & Houghton 2012).

Como se ha resaltado, las plantas medicinales juegan un papel importante en el manejo de la EA y el déficit de memoria. Los métodos terapéuticos tradicionales importantes son los sistemas del interés global de la profesión médica se centra en las plantas medicinales. El sistema tradicional de medicina es fundamentalmente preventivo, protector, nutritivo y curativo (Akram & Nawaz 2017).

2.13 Relevancia etnofarmacológica en la EA:

El déficit de memoria es un importante problema de salud global. Las terapias actuales son inadecuadas y tienen numerosos efectos adversos. Existe una necesidad urgente de posibles tratamientos alternativos para la EA y el déficit de memoria. Se prescriben varias plantas medicinales para mejorar la memoria. Hemos revisado la literatura sobre plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de la EA y el déficit de memoria (Xu et al., 2009). Varias plantas medicinales se han utilizado durante décadas en diferentes culturas para mejorar la memoria (Akram & Nawaz 2017). La EA es un trastorno neurodegenerativo perjudicial que deteriora la memoria, las funciones cognitivas y puede conducir a la demencia en la etapa tardía de la vida. La causa patogénica de la EA sigue sin comprenderse y los medicamentos aprobados por la FDA son inhibidores parciales en lugar de curativos. La mayoría de los

fármacos son productos sintéticos o naturales, ya que la galantamina es un alcaloide obtenido de *Galanthus spp.* En la Medicina china y ayurvédicos, las plantas medicinales se usan para tratar la EA, los cambios neurodegenerativos y las enfermedades cognitivas. Varios medicamentos occidentales que se usan en la pérdida de memoria y se derivan de las plantas. Los alcaloides derivados de plantas como la anticolinesterásicos se han utilizado para tratar la EA. En el Reino Unido, la galantamina derivada de plantas también se usa en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos (Akram & Nawaz 2017). La sobreexplotación de plantas medicinales con principios bioactivos limitados ha proporcionado plantillas para diseñar drogas sintéticas en el tratamiento del EA. Rivastigmina, fenerina, eptastigmina basada en la estructura química de fisostigmina de *Physostigma venenosum* Balf. Otro ejemplo destacable en este grupo es la huperzina A (HupA), de origen natural aislada de una pteridofita, una planta medicinal de la familia Lycopodaceae llamada *Huperzia serrata*. Es el candidato a fármaco más prometedor con un potente efecto anticolinesterásico, el cual se trata de un medicamento anti-EA con licencia en China (Orhan et al., 2011 y Sahoo et al., 2018). La HupA ha logrado una nueva dirección en el desarrollo de fármacos en el tratamiento de la EA.

2.14 Huperzina A (HupA)

El alcaloide huperzina A (figura 2.9) se encuentra en las especies de los licopodios *Huperzias* y *Phlegmariurus*. La HupA es un inhibidor de la acetilcolinesterasa de primera línea y se ha afirmado que la huperzina A de *Huperzia serrata* es efectiva en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Manoharan et al., 2016). La HupA es un medicamento con licencia contra la enfermedad de Alzheimer en China y está disponible como nutracéutico en los EE. UU. (Orhan et al., 2011).

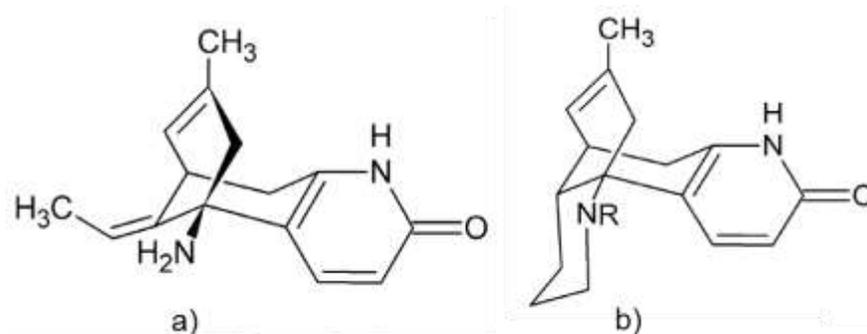


Figura 2.9. Alcaloides aislados de plantas del género *Huperzia*: a) huperzina A y b) huperzina B

2.14.1 Mecanismo de Acción de la HupA

La huperzina A es un alcaloide sesquiterpénico del tipo quinolizidina. Es un inhibidor potente y selectivo y bien tolerado de la acetilcolinesterasa (AChE), la cual degrada al neurotransmisor acetilcolina (ACh). Fue aislado por primera vez de la planta medicinal popular china *Huperzia serrata* (Qian Ceng Ta) (Zhang et al., 2008; Qian y Ke, 2014). La huperzina A previene el deterioro cognitivo y el daño cerebral (Wang et al., 2002), y también protege contra la isquemia cerebral focal transitoria en ratas, posiblemente a través de una vía antiinflamatoria colinérgica que involucra el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) (Wang et al., 2008). Se encontró un efecto protector contra la inflamación y los déficits cognitivos en ratas con hipoperfusión cerebral mediante la administración de huperzina A (Wang et al., 2010). Además, la huperzina A, ha exhibido una disminución de las actividades de apoptosis, ROS y caspasa-3 en neuronas corticales de rata inducidas por A β (Xiao et al., 2002).

La huperzina A fue identificada por los científicos en China en la década de 1980 como un inhibidor potente, reversible, selectivo de la acetilcolinesterasa (AChE), que tiene un mecanismo de acción similar al donepezilo, rivastigmina y galantamina. Un gran número de estudios preclínicos y ensayos clínicos había demostrado el efecto potencial de la huperzina A en el tratamiento de EA. En una revisión sistemática publicada por Cochrane (2008) indica la realización de 6 ensayos aleatorios con 454 participantes con la EA sugiere que la huperzina A parece tener algunos efectos beneficiosos sobre esta enfermedad (Yang et al., 2013).

2.14.2 Propiedades Farmacológicas

2.14.2.1 Efectos Colinérgicos de la HupA

Se descubrió que la huperzina A posee muchas de las actividades farmacológicas, como la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE). Este descubrimiento encendió una gran cantidad de investigación dirigida a evaluar el alcance de los efectos farmacológicos de HupA y su potencial clínico. La HupA se obtiene con bajos rendimientos (0.011%) de la lycophyta *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. (Lycopodiaceae), que se usa en varias formulaciones en la medicina tradicional China (MTC) para enfrentar los problemas asociados con la pérdida de memoria y la inflamación (Tun y Herzon 2012). Debido al bajo rendimiento de HupA producido por la esta especie vegetal se ha buscado desarrollar fuentes alternativas como la biotecnología. La HupA puede entrar fácilmente en el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica y tiene ambos efectos terapéuticos centrales y periféricos. Aunque la HupA actualmente se usa menos que los otros 3 fármacos iAChE, un meta-análisis de 20 ensayos controlados aleatorios con 1823 pacientes con EA confirmó su eficacia y la seguridad.

Este fármaco no sólo se utiliza para mejorar el déficit cognitivo en pacientes con EA, sino también se considera como un modificador de la enfermedad que puede disminuir el hierro y los niveles del β amiloide ($A\beta$) en el cerebro. Puede haber posibles efectos colinérgicos aditivos si se toma HupA con otros iAChE como galantamina o donepezil. Además, la HupA puede tener efectos aditivos si se toma con β bloqueadores que causan bradicardia, lo que puede disminuir la frecuencia cardíaca. No se recomienda el uso de HupA durante el embarazo y la lactancia debido a la falta suficientes datos de seguridad (Zhang et al., 2020).

2.14.3 Efectos No Colinérgicos de la HupA

Otros estudios han demostrado que la HupA además de inhibir reversiblemente la AChE (efectos colinérgicos) también es antagonista del receptor NMDA. (Ratia et al., 2013; Huang et al., 2014), además del efecto sintomático y de mejora cognitiva de la inhibición de la colinesterasa. Estos nuevos hallazgos han mejorado enormemente nuestra comprensión de los mecanismos farmacológicos de HupA en el tratamiento de la EA. Como es sabido, además del efecto sintomático y de mejora cognitiva a través de la inhibición de AChE, varios estudios recientes han informado que este medicamento tiene efectos "no colinérgicos" sobre la EA (Wang et al., 2009). Algunos estudios indican el mejoramiento de la memoria en ratas con deterioro cognitivo y se ha demostrado neuroprotección contra el fragmento de péptido β -amiloide además de evitar la citotoxicidad inducida por radicales libres. Para atenuar la apoptosis la HupA inhibe las mitocondrias vía de la caspasa. Debido a sus sobresalientes propiedades farmacocinéticas, como la rápida absorción y una amplia distribución con una tasa moderada de eliminación, es un medicamento ampliamente aceptado en la EA en China. El ensayo clínico de fase II se fijó la dosis máxima tolerada de huperzina A hasta 0.4 mg dos veces al día durante 24 semanas, lo que demostró un beneficio significativo para la mayoría de los pacientes que fueron intolerantes a otros inhibidores de la AChE durante un largo período de tiempo. Actualmente se comercializa en China y se ha llevado a cabo un ensayo clínico de fase III bien diseñado en EE. UU. y en otras demencias. Damar *et al.*, en el 2017 han propuesto la hipótesis de que la HupA puede mejorar los síntomas de la epilepsia en pacientes con EA, que puede evitar los efectos adversos de los fármacos antiepilépticos tradicionales. A pesar de esto, no existe actualmente ninguna investigación clínica de alta calidad en el tratamiento con HupA. Debido a sus relevantes propiedades farmacocinéticas, se ha prestado más interés en la eficacia y las reacciones adversas cuando se utiliza la huperzina A (Zhang et al., 2020).

2.14.4 Efectos no colinérgicos de la HupA en la EA

Varios estudios recientes han informado que HupA tiene propiedades neuroprotectoras, que poseen efectos "colinérgicos" y "no colinérgicos" sobre la EA (Figura 2.10). A continuación se detallan los efectos no colinérgicos presentados por la HupA (Qian & Ke 2014):

- Protección de las neuronas contra las lesiones y apoptosis inducidas por inducción;
- Mejora el malfuncionamiento mitocondrial en el cerebro con EA;
- Efectos antagonizantes en receptores de n-metil-d-aspartato;
- Regulación de la expresión y secreción del factor de crecimiento nervioso;
- Promueve el procesamiento de proteína del precursor de amiloides no amiloidégeno;
- Activa la proteinquinasa c y la ruta de señalización de wnt / b-catenina;
- Reduce el hierro en cerebro de pacientes con EA.

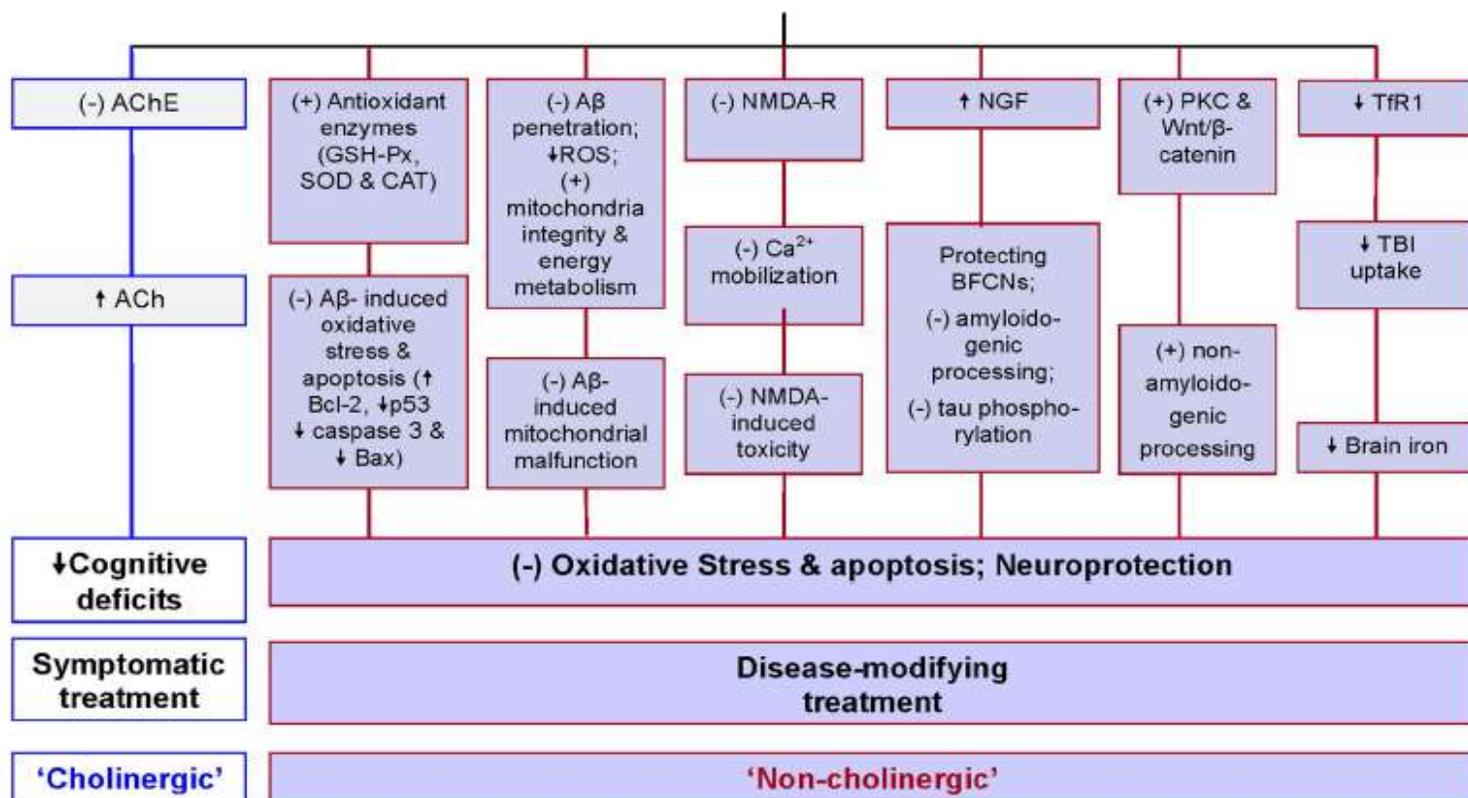
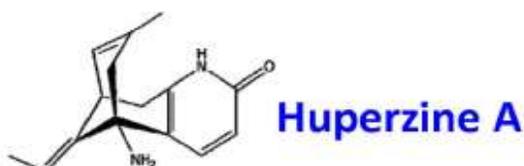


Figura 2.10. Resumen de los mecanismos farmacológicos de la HupA en el tratamiento de la EA, efectos colinérgicos y no colinérgicos (Qian & Ke 2014)

2.14.5 Fuentes de huperzina A

La planta medicinal *Huperzia serrata* es la fuente original de la huperzina A. Se ha reportado un bajo contenido de HupA (aproximadamente 0.007%), que varía de 0.0047 a 0.025% dependiendo de las estaciones de recolección y las regiones de crecimiento, con distribución geográfica limitada y una tasa de crecimiento muy lenta. Se tarda un mínimo de 15 años desde la germinación de esporas hasta la etapa de gametofito para llegar finalmente a la etapa de esporofito maduro. Además, esta especie está a punto de extinguirse en un futuro próximo. Por lo tanto, la síntesis total orgánica y el cultivo *in vitro* se han aplicado para la producción en masa de HupA. Debido a estas razones, la propagación *in vitro* del material vegetal ha atraído más interés en los últimos años. Desafortunadamente, los esfuerzos en esta área han llevado a un éxito limitado. Muchos análogos y derivados de la HupA fueron preparados y probados por sus actividades inhibitorias hacia AChE. La síntesis total del compuesto se ha logrado hasta la fecha, sin embargo, su mezcla racémica sintética exhibió menos actividad inhibidora de AChE que la de la HupA natural (Orhan *et al.*, 2011).

2.15 Pteridofitas

Las *Pteridofitas* constituyen las plantas sin semillas, y están ampliamente distribuidas en todo el mundo, siendo que la mayoría se encuentra en los trópicos. Actualmente, pueden ser clasificadas en cinco clases, siendo estas *Lycopodiopsida*, *Psilotopsida*, *Equisetopsida*, *Marattiopsida* y *Polypodiopsida*. Las *Pteridofitas* se presentan en una extraordinaria variedad de ambientes, que abarcan zonas árticas y alpinas al interior de florestas pluviales tropicales vegetación arbórea sub-desértica, rocas costeras y manglares. El 80% de las especies se encuentran en áreas tropicales, siendo más comunes en montañas tropicales y subtropicales húmedas. Particularmente, las montañas presentan alta riqueza y endemismo de especies de *Pteridofitas*, que coinciden con regiones montañosas en el Neotrópico (Øllgaard, 1990; Pereira, 2003). La región neotropical concentra importantes áreas geográficas de *Pteridofitas* con cuatro regiones de alta diversidad que reúnen aproximadamente el 40% de especies endémicas: las Grandes Antillas, el sureste de México y América Central, la región de los Andes, el sureste y sur de Brasil, y Argentina.

Plantas del *Phylum* Pteridophyta han sido consideradas un importante blanco para estudios farmacológicos, siendo reportadas, entre otras, actividad antimicrobiana, antiviral, hepatoprotectora, antitumoral, citoprotectora y anti-gonadotrópica, tanto para extractos como para metabolitos aislados de diferentes especies (Imperato, 2001). Entre los metabolitos

secundarios aislados de estas especies se destacan los alcaloides, polifenoles, flavonoides y biflavonoides. En el grupo de los alcaloides se destacan aquellos aislados e identificados a partir de plantas de la familia *Huperziaceae* recientemente aceptada como *Lycopodaceae*, como las huperzinas y los alcaloides del *lycopodium* (Liu *et al.*, 1986; Zangara, 2003).

Dentro de la división Pteridofita se encuentra la familia *Lycopodiaceae* que incluye 400 especies en el mundo. Son ampliamente distribuidas en zonas tropicales templadas y frías, (Zangara, 2003). En 1992 Wagner y Beitel reconocieron que la familia *Huperziaceae* estaba conformada por los géneros *Phlegmariurus* y *Huperzia*. Por muchos años esta clasificación ha sido empleada a nivel mundial; además de la relación quimiotaxonómica marcada por la presencia de un compuesto alcaloideo, empleado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la HupA, que ha sido identificado únicamente en estos géneros. Sin embargo, recientemente Testo *et al.* (2018) propusieron a la subfamilia Huperzioidae, como la familia *Lycopodiaceae*, que está conformada por tres géneros: *Phlegmariurus*, *Huperzia* y *Phylloglossum*.

2.15.1 Género *Phlegmariurus*

En particular el género *Phlegmariurus* es el más numeroso de la familia *Lycopodaceae*; es de amplia distribución y ha sido encontrado desde el nivel del mar hasta 3000 m; son plantas epífitas péndulas, presentan tallos dicotómicos y hojas micrófilas alternadas, con esporangios generalmente solitarios. En el caso particular de *Huperzia taxifolia*, ésta ha sido reclasificada como *Phlegmariurus taxifolius*.

Phlegmariurus es un género de casi 200 especies de la familia *Huperziaceae*. Hasta ahora, seis especies del género *Phlegmariurus* se han investigado químicamente, y 89 compuestos, incluyendo alcaloides de *Lycopodium* que poseen diversas estructuras y de tipo serratane triterpenos, se han aislado. Estos compuestos muestran bioactividades potentes, tales como actividades citotóxicas e inhibitoras de la acetilcolinesterasa (Yang *et al.*, 2016).

Phlegmariurus es un género que se encuentra principalmente distribuido en el Asia tropical y subtropical, con 23 especies que son endémicas al sur de China. Las plantas enteras de varias especies del género *Phlegmariurus* se han utilizado en la medicina tradicional china (MTC). Por ejemplo, *P. phlegmaria* se ha utilizado para el tratamiento de dolor reumático, artritis, lesión traumática, dolor de garganta, edema, urticaria. La HupA, como se ha mencionado, es un inhibidor de la acetilcolinesterasa potente, reversible, y selectivo. Es un fármaco prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer el cual fue descubierto

de *Huperzia serrata* (Huperziaceae reclasificada como Lycopodaceae). Numerosos esfuerzos en el aislamiento de nuevos alcaloides potentes de *H. serrata* y plantas relacionadas se han llevado a cabo por muchos grupos de investigación, que condujo al aislamiento de una serie de componentes de las plantas, especialmente alcaloides y terpenos de lycopodios con diversas estructuras de muchos esqueletos inusuales de interés desde puntos biogénéticos y biológicos de vista y objetivos desafiantes.

2.15.2 *Phlegmariurus taxifolius*

La especie vegetal *Phlegmariurus taxifolius* (Sw.) Á. Löve et D. Löve [= *Huperzia taxifolia* (Sw.) Trevis, *Lycopodium taxifolium* Sw.] es una planta epífita, tallos arqueado-decumbentes a péndulos, de hasta 30 cm de largo y 2 a 4 mm de ancho excluyendo las hojas, 2 a 6 bifurcados; con hojas de las divisiones proximales en verticilos alternos de 3 a 4, lineares a lanceoladas, con 13 a 20 mm de largo y 2 a 3 mm de ancho, patentes a ascendentes o algo adpresas, márgenes aplanados a escasamente revolutos. Crecen en Nebliselvas, bosques húmedos y bosques de pino-encinos (900 a 1800 m); de México a Bolivia, las Antillas (Davidse *et al*, 1995).

Ma *et al.* (1998) estudiaron la relación entre los diferentes lycopodios y propuso que la presencia de HupA se relacionaba quimiotaxonómicamente con algunas especies. Se descubrió que este alcaloide presenta actividad anticolinesterásica muy específica, con importante aplicación en la enfermedad de Alzheimer.

En México crecen aproximadamente 15 especies de lycopodios, incluyendo *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, por lo que se ha motivado a la investigación en la búsqueda de nuevos alcaloides anticolinesterásicos en esta familia de plantas, potencialmente útiles en el tratamiento del Alzheimer, una vez que muchos alcaloides inéditos han sido continuamente aislados e identificados a partir de especies de lycopodios (Ma *et al.*, 2007). Dentro de este grupo de lycopodios también se encuentra *Phlegmariurus taxifolius*, el cual carece de estudios fitoquímicos, biológicos y farmacológicos, además que esta planta se encuentra en peligro vulnerable de extinción. Por tal razón, la biotecnología vegetal es una alternativa prometedora para la conservación de las especies de lycopodios y de estrategias para la búsqueda de nuevas fuentes y procesos de producción de huperzina A.

Los alcaloides de *Lycopodium* representan una variedad diversa de moléculas de las lycophytas pertenecientes a la familia Lycopodiaceae. Como se ha mencionado los alcaloides más sobresalientes son la huperzina A y B, destacando la HupA como un potente inhibidor de la AChE para lo cual se considera un potencial fármaco líder para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el desarrollo farmacéutico adicional se ve obstaculizado por la falta de un reabastecimiento sostenible del compuesto. Aunque se han propuesto una serie de técnicas, como la síntesis total y la fermentación de microorganismos productores de HupA, la principal fuente de este alcaloide todavía depende en gran medida de los materiales a base de hierbas, que podría conducir a la sobreexplotación (Xu *et al.*, 2018). Por esta razón es importante investigar en nuevas fuentes de HupA, derivados y otros metabolitos para el tratamiento de la EA empleando herramientas biotecnológicas como la micropropagación y cultivo *in vitro* de brotes de licofitas como las especies de *Huperzia* y *Phlegmariurus*.

2.15.3 Estudios Fitoquímicos de *Phlegmariurus*

Según la literatura, hasta ahora, seis especies del género *Phlegmariurus* han sido químicamente investigadas, y se han aislado una variedad de compuestos estructuralmente interesantes, incluyendo alcaloides de licopodios que poseen diversas estructuras de **triterpenos tipo serratano**. Estos compuestos muestran potentes actividades farmacológicas, tales como actividades inhibitorias de la acetilcolinesterasa y actividades citotóxicas.

Desde la década de 1960, los compuestos 1-89, descritos en la revisión de Yang *et al.*, (2016) (tabla 2.6 y 2.7), han sido aislados de las plantas del género *Phlegmariurus*. Sus estructuras se muestran a continuación, sus nombres correspondientes y fuentes de la planta (tablas 2.6 y 2.7). Como se puede ver los alcaloides y los triterpenoides de tipo serratano son los constituyentes químicos dominantes en las plantas del género *Phlegmariurus* (figuras 2.11 y 2.12) (Yang *et al.*, 2016).

2.15.1 Alcaloides

Los alcaloides 1-59 han sido aislados del género *Phlegmariurus* (tabla 2.6). Los alcaloides Licopodina 1-20 fueron aislados de *P. carinatus*, *P. fargesii*, *P. fordii*, *P. phlegmaria*, *P. squarrosus*, y *P. yunnanensis*. Esta clase se caracteriza porque cuatro anillos de los seis miembros están conectados, en las posiciones C (5), C (6), C (8), C (10), y C (12) por lo general se oxida a C=O y grupos OH o esterificado por AcOH y ácido dihidroferulico, y el enlace C=C

puede existir en C (11/12) y C (8/15). Además, el átomo de N podría ser oxigenado como N-óxido, tal como en licopodina N-óxido (9).

De los alcaloides identificados y en este género mas destacables son: la **huperzina A (28)**, huperzinina (29), isofordina (30), y phlegmariurina M (31) entre otros (Yang *et al.*, 2016).

2.15.2 Terpenoides

Se han encontrado metabolitos terpenoides del tipo Triterpeno y diterpeno (Yang *et al.*, 2016):

2.15.2.1 Triperpenos. Los veintinueve triterpenoides (tablas 2.6 y 2.7), 60-88, fueron aislados de *P. phlegmaria*, *P. squarrosus* y *P. yunnanensis*. Los Terpenos mas relevantes son los del 60- 87, que pertenecen a los **Triterpenos del tipo serratano**, en el que las posiciones C (3) y C (21) podrían oxidarse a grupos OH o más esterificados por ácido acético y cinámico, y el enlace C=C puede existir en C (14/15). A veces, C (24), C (29), o C (30) también podría estar oxidado a grupos OH, y C (24) podría ser oxidado a ácido carboxílico. Además, el enlace C=C en C (14/15) se puede hidratar al grupo OH. α -onocerina (88) fue aislado de *P. phlegmaria*.

2.15.2.2 Diterpenos. El diterpeno tipo abietano, margocilina (89) fue aislado de *P. phlegmaria* (Yang *et al.*, 2016).

Tabla 2.6. Constituyentes químicos (1-81) del género *Phlegmariurus* (tomado de Yang *et al.*, 2016)

Table. Chemical Constituents from the Genus <i>Phlegmariurus</i> ^{a)}				Table. (cont.)			
No.	Compound class and name	Source	References	No.	Compound class and name	Source	References
	Alkaloids						
1	Lycopodine	<i>P. carinatus</i>	[9]	44	Lobscurinol	<i>P. carinatus</i>	[9]
		<i>P. fargesii</i>	[10]	45	Lycophlegmarine	<i>P. phlegmaria</i>	[16]
		<i>P. phlegmaria</i>	[11]	46	Obscurinine	<i>P. carinatus</i>	[9]
2	Lycodoline	<i>P. carinatus</i>	[9]	47	8-Deoxy-13-dehydroserratinine	<i>P. carinatus</i>	[9]
		<i>P. squarrosus</i>	[12]			<i>P. squarrosus</i>	[12]
		<i>P. fordii</i>	[13]			<i>P. phlegmaria</i>	[16]
3	8b-Acetoxy-12b-Hydroxyepidihydrolycopodine	<i>P. squarrosus</i>	[12]	48	Lycoserramine U	<i>P. squarrosus</i>	[12]
4	Dihydrolycopodine	<i>P. phlegmaria</i>	[11]	49	Acetyllycoserramine U	<i>P. squarrosus</i>	[12]
5	6a-Hydroxylycopodine	<i>P. fargesii</i>	[10]	50	8b-Acetyllycoserramine U	<i>P. squarrosus</i>	[12]
6	Deacetyllycoclavine	<i>P. fargesii</i>	[10]	51	Lycoflexine	<i>P. carinatus</i>	[9]
7	15a-Methyllycopodane-5b,6b-diol	<i>P. yunnanensis</i>	[14]			<i>P. squarrosus</i>	[12]
8	Malycorin C	<i>P. phlegmaria</i>	[15]			<i>P. phlegmaria</i>	[16]
9	Lycopodine N-oxide	<i>P. fargesii</i>	[10]	52	N-Oxide-lycoflexine	<i>P. carinatus</i>	[9]
10	15a-Methyllycopodane-5b,6b-Diol N-oxide	<i>P. yunnanensis</i>	[14]	53	Carinatine B	<i>P. carinatus</i>	[9]
11	Lucidioline	<i>P. carinatus</i>	[9]	54	Malycorin A	<i>P. phlegmaria</i>	[15]
12	Gnidiodine	<i>P. carinatus</i>	[9]	55	Phlegmarine	<i>P. fargesii</i>	[10]
13	Malycorins B	<i>P. carinatus</i>	[9]	56	N,N ⁰ -Dimethylphlegmarine	<i>P. phlegmaria</i>	[16]
		<i>P. phlegmaria</i>	[15]	57	Huperminone A	<i>P. phlegmaria</i>	[19]
14	Acrifoline	<i>P. phlegmaria</i>	[11]	58	Hupermine A	<i>P. phlegmaria</i>	[6]
15	Lycophlegmine	<i>P. phlegmaria</i>	[16]	59	Phlegmariurine N	<i>P. fordii</i>	[23]
16	Lycopodatine C	<i>P. carinatus</i>	[9]				
17	8,15-Dehydrolycopodine	<i>P. fargesii</i>	[10]				
18	Lycoserramine H	<i>P. yunnanensis</i>	[14]	60	Serratenediol	<i>P. squarrosus</i>	[24]
19	Annotine	<i>P. phlegmaria</i>	[11]			<i>P. yunnanensis</i>	[14]
20	Annotinine	<i>P. phlegmaria</i>	[11]			<i>P. phlegmaria</i>	[25]
21	Lycodine	<i>P. carinatus</i>	[9]	61	Serratenediol-3-acetate	<i>P. squarrosus</i>	[24]
		<i>P. squarrosus</i>	[12]			<i>P. yunnanensis</i>	[14]
		<i>P. fargesii</i>	[10]			<i>P. phlegmaria</i>	[25]
22	b-Obscurine	<i>P. phlegmaria</i>	[11]	62	21-Episerratenediol (= 21b-hydroxyserrat-14-en-3a-ol)	<i>P. phlegmaria</i>	[26]
23	des-N-Methyl-b-obscurine	<i>P. squarrosus</i>	[12]			<i>P. squarrosus</i>	[24]
24	a-Obscurine	<i>P. phlegmaria</i>	[11]	63	21b-Hydroxy-serrat-14-en-3a-yl acetate	<i>P. phlegmaria</i>	[27]
25	11b-Acetoxy-N-methylhuperzine B	<i>P. squarrosus</i>	[12]	64	21b-Hydroxy-serrat-14-en-3b-ol	<i>P. phlegmaria</i>	[26]
26	N-Methylhuperzine B	<i>P. fargesii</i>	[10]	65	21a-Hydroxy-serrat-14-en-3b-ol	<i>P. phlegmaria</i>	[26]
27	Fordimine	<i>P. fordii</i>	[18]	66	21a-Hydroxy-serrat-14-en-3b-yl acetate	<i>P. phlegmaria</i>	[26]
28	Huperzine A	<i>P. squarrosus</i>	[17]	67	Phlegmanol A	<i>P. squarrosus</i>	[24]
		<i>P. phlegmaria</i>	[19]			<i>P. phlegmaria</i>	[25]
29	Huperzinine	<i>P. squarrosus</i>	[12]	68	21a-Hydroxy-serrat-14-en-3b-yl propanedioic acid monoester	<i>P. squarrosus</i>	[24]
30	Isofordine	<i>P. fordii</i>	[20]			<i>P. squarrosus</i>	[24]
31	Phlegmariurine M	<i>P. fordii</i>	[21]	69	Phlegmanol C	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
32	Carinatine A	<i>P. carinatus</i>	[9]	70	Phlegmanol B	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
33	Fawcettimine	<i>P. carinatus</i>	[9]	71	Hydroxyserratene	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
		<i>P. squarrosus</i>	[12]	72	Serratol	<i>P. yunnanensis</i>	[14]
34	Alopecuridine	<i>P. squarrosus</i>	[12]			<i>P. phlegmaria</i>	[25]
35	Fawcettidine	<i>P. squarrosus</i>	[12]	73	Serrat-14-ene-3b,21a,24-triol	<i>P. squarrosus</i>	[24]
		<i>P. phlegmaria</i>	[16]	74	Lycophlegmariol A	<i>P. phlegmaria</i>	[27]
36	8b-Acetoxyfawcettimine	<i>P. squarrosus</i>	[12]	75	Lycophlegmariol C	<i>P. phlegmaria</i>	[27]
37	8-Deoxyserratidinine	<i>P. phlegmaria</i>	[16]	76	(3a,21a)-Serrat-14-ene-3,21,24,29-tetraol (= lycocryptol)	<i>P. squarrosus</i>	[24]
38	Epidihydrofawcettidine (= lycoserramine Q)	<i>P. phlegmaria</i>	[16]			<i>P. yunnanensis</i>	[14]
		<i>P. carinatus</i>	[9]	77	Phlegmanol E	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
39	Phlegmariurine A	<i>P. carinatus</i>	[9]	78	Lycophlegmariol B	<i>P. phlegmaria</i>	[27]
		<i>P. fordii</i>	[22]	79	(3a,21b)-Serrat-14-ene-3,21,24,29-tetraol	<i>P. squarrosus</i>	[24]
40	Phlegmariurine B	<i>P. carinatus</i>	[9]				
		<i>P. squarrosus</i>	[12]	80	(3a,21b)-Serrat-14-ene-3,21,24,30-tetraol	<i>P. squarrosus</i>	[24]
		<i>P. fordii</i>	[22]				
41	Phlegmariurine C	<i>P. fordii</i>	[18]	81	Phlegmaric acid	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
42	Lycopodine A	<i>P. squarrosus</i>	[12]				
43	8a-Hydroxylycojapodine A	<i>P. squarrosus</i>	[12]				

Tabla 2.7. Constituyentes químicos (82-89) del género *Phlegmariurus* (tomado de Yang *et al.*, 2016)

No.	Compound class and name	Source	References
82	3a,21a-Dihydroxyserrat-14-en-24-oic acid	<i>P. squarrosus</i>	[24]
83	(3a,14a,15a,21a)-3,14,15,21,29-Pentahydroxyserrat-24-oic acid	<i>P. squarrosus</i>	[24]
84	Tohogenol	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
85	Phlegmanol D	<i>P. phlegmaria</i>	[25]
86	Lycophlegmarin	<i>P. phlegmaria</i>	[26]
87	Lycophlegmariol D	<i>P. phlegmaria</i>	[27]
88	α -Onocerin	<i>P. phlegmaria</i>	[28]
89	Margocilin	<i>P. phlegmaria</i>	[27]

^{a)} *Phlegmariurus phlegmaria* = *Lycopodium phlegmaria* = *Huperzia phlegmaria*.

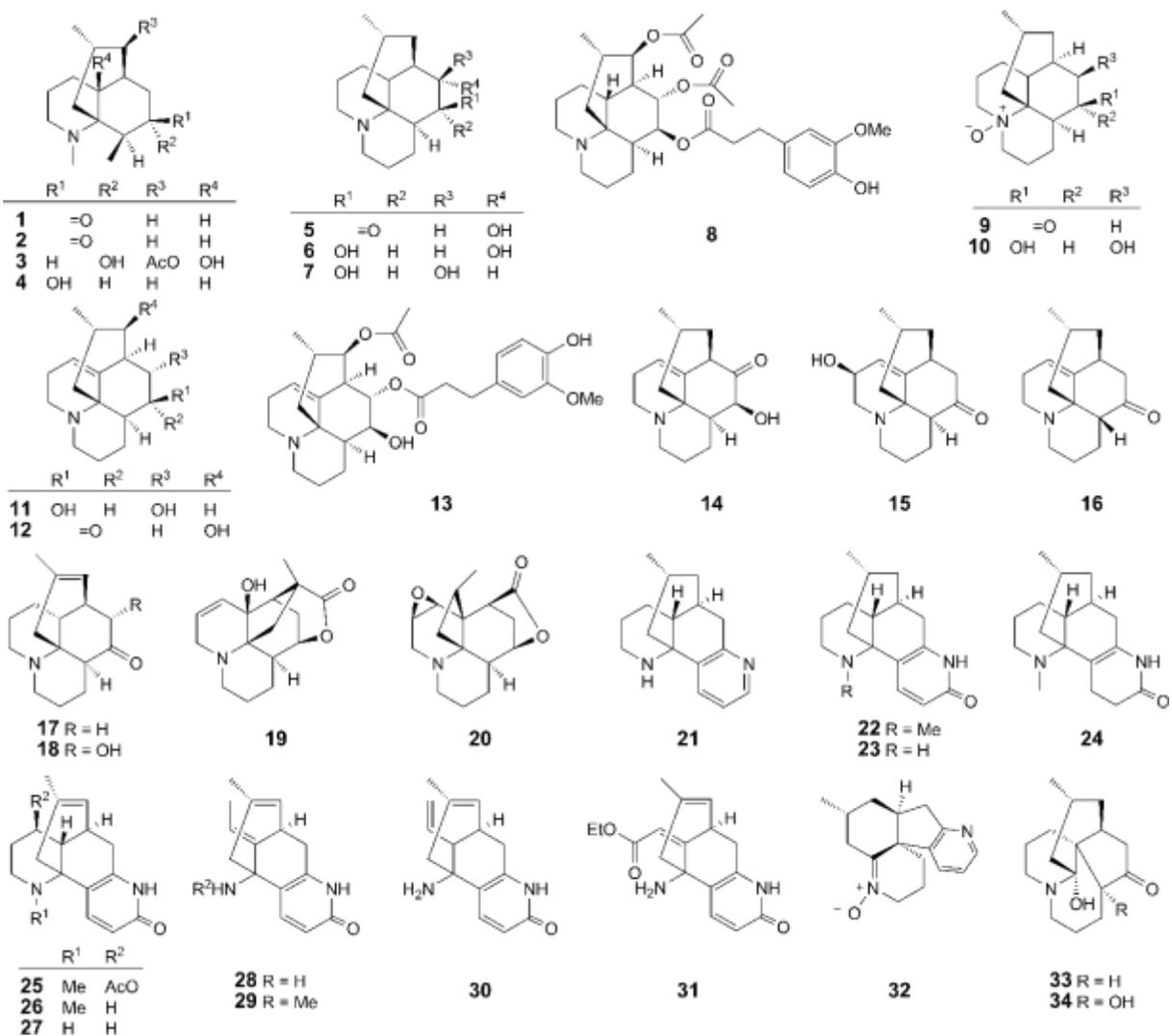


Figura 2.11. Constituyentes químicos (1-34) del género *Phlegmariurus* (tomado de Yang *et al.*, 2016)

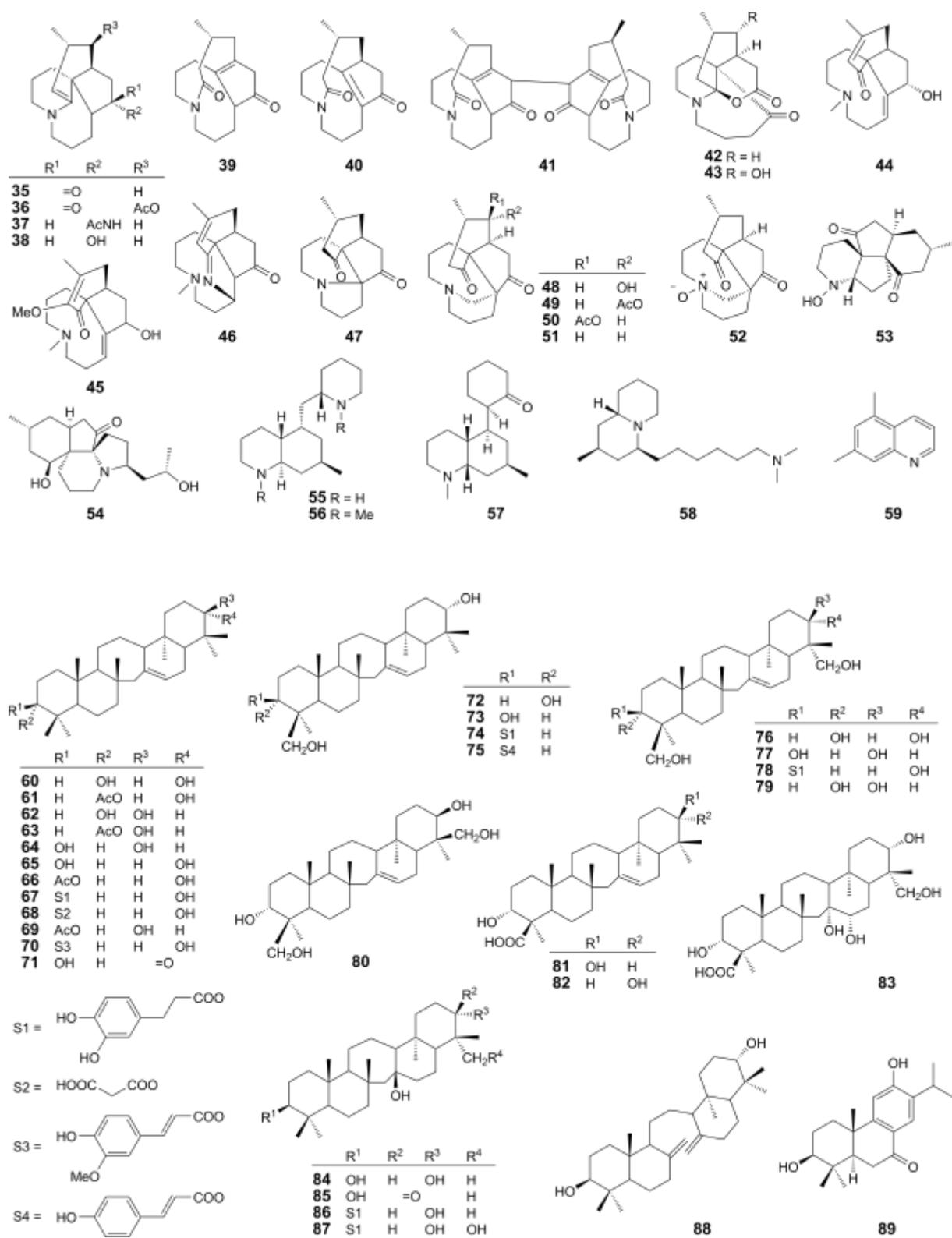


Figura 2.12. Constituyentes químicos (35-89) del género *Phlegmariusus* (tomado de Yang *et al.*, 2016)

2.16 Micropropagación de plantas medicinales.

La micropropagación de plantas para el cultivo *in vitro* ha sido un proceso útil de propagación vegetativa para la agricultura, la horticultura y más recientemente para la biotecnología vegetal. La micropropagación puede realizarse mediante embriogénesis somática y cultivo de brotes axilares y brotes adventicios. A través de la micropropagación de plantas, se pueden obtener plántulas de alta calidad, libres de virus, resistentes a enfermedades, y altos rendimientos de componentes medicinales. Las plántulas también se pueden usar para plantaciones de campo a gran escala. El desarrollo y la aplicación de técnicas de micropropagación para plantas medicinales son importantes para la preservación, la producción rápida y el estudio de especies valiosas de hierbas. Además, la micropropagación se puede combinar con otros enfoques biotecnológicos para mejorar las plantas medicinales a través de la variación somaclonal y la transformación genética (Zhou & Wu 2006).

Desde tiempos inmemoriales, los seres humanos han usado los productos vegetales como fuentes de productos farmacéuticos, agroquímicos, y nutricionales. Incluso hoy en día, casi la totalidad de la población mundial depende de los productos derivados de las plantas. En los últimos tiempos, la biotecnología ofrece oportunidades atractivas para la producción de plantas basados en sistemas *in vitro* (cultivos de callos, cultivos de suspensión celular, y cultivos de tejidos) y para la manipulación genética para facilitar la generación de plantas y productos vegetales. A medida que se destruye rápidamente un número creciente de hábitats naturales, las técnicas biotecnológicas *in vitro* pueden ayudar a contrarrestar la extinción de especies en peligro de extinción (Efferth, 2019). Adicionalmente el cultivo de callos puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal (Rodriguez et al., 2014)

Como se ha mencionado, muchos metabolitos secundarios no sólo revelan funciones protectivas, sino que también poseen valor medicinal para los seres humanos. Por lo tanto, cultivos de células vegetales representan fuentes interesantes para la producción fácil y escalable de metabolitos secundarios. Los enfoques han sido desarrollados para optimizar condiciones de cultivo y aumentar el rendimiento de estos metabolitos secundarios en las plantas. Por lo tanto, la biotecnología vegetal también puede complementar la agricultura tradicional a escala industrial (Jiang *et al.*, 2015). El cultivo de tejidos vegetales representa una

técnica importante en ciencia básica y aplicación comercial. En todas las principales familias de plantas terrestres el tejido herido es recuperado por células callosas no diferenciadas. Estas células de callo pueden cultivarse *in vitro* para aplicaciones biotecnológicas. Casi cualquier parte de la planta se puede utilizar para generar cultivos de callos. Los explantes tomados de tejidos de las plantas crecen lentamente *in vitro* en una masa de células que va desde amorfo e incoloro a marrón pálido, estas se obtienen en condiciones estériles para evitar la infección microbiana y se cultivan en medio de agar sólido suplementado con hormonas de crecimiento (auxinas, citocininas). Para la realización de los pases de las células, los cultivos de callos pueden ser mantenidos indefinidamente *in vitro* (Efferth, 2019).

2.17 Callogénesis

Tener una gran plasticidad para la diferenciación celular es una característica central de las células vegetales. Las plantas generan masas celulares no organizadas, como callos o tumores, en respuesta a diversos factores como heridas o infecciones por patógenos. La formación de callos en árboles descortezados se describió hace más de 200 años. El término "callo" se origina de la palabra latina "*callum*", que significa duro. Los "callos" en los inicios de la biología vegetal se referían al crecimiento masivo de células y la acumulación de callos asociados con las heridas. Actualmente la misma palabra se usa de manera más amplia y las masas celulares desorganizadas se denominan colectivamente callos (Ikeuchi, *et al.*, 2013). Las células de tejido diferenciadas en los tejidos vegetales son capaces de diferenciar y regenerar el tejido herido o incluso toda la planta. También pueden formar células callosas totipotentes (Burris *et al.*, 2009). Se cree que al menos algunas formas en la generación de callos implican la desdiferenciación celular. Por lo tanto, el término callo incluye células con diversos grados de diferenciación (Ikeuchi, *et al.*, 2013).

2.17.1 Formación de callos *in vitro* y en la naturaleza

2.17.2 Callos inducidos por heridas

Como se indicó anteriormente, la formación de callos inducidos por heridas se habían observado inicialmente en el descortezado de los árboles. Estos callos a menudo acumulan fitoalexinas y proteínas relacionadas con los patógenos. Debido a esto, se cree que se evita la infección y la pérdida de agua. El callo inducido por heridas deriva de varios tipos de células y en algunos casos, los callos inducidos por heridas regeneran nuevos órganos o nuevos tejidos, lo que sugiere que son altamente pluripotentes (Ikeuchi, *et al.*, 2013).

2.17.3 Tumores inducidos por patógenos.

La agalla de la corona es una enfermedad de la planta causada por la bacteria gramnegativa *Agrobacterium tumefaciens* (recientemente renombrada como *Rhizobium rhizogenes*), y ocurre en miles de especies de plantas. Estas bacterias ingresan a las plantas a través de los sitios de la herida y promueven el crecimiento tumoral de una masa celular no organizada (Ikeuchi, *et al.*, 2013).

2.17.4 Callos formados bajo condiciones de cultivo *in vitro*

La aplicación exógena de auxinas y citocininas induce la formación de callos en varias especies vegetales. En términos generales, una proporción intermedia de auxina y citocinina promueven la inducción de callos, mientras que una alta proporción de auxina:citocinina y de citocinina:auxina induce la regeneración de raíces y de brotes respectivamente. Otras hormonas, como los brasinoesteroides o el ácido abscísico, también inducen callos y en algunas especies, pueden sustituir las auxinas o las citocininas en la formación de callos. Sin embargo, las auxinas y la citoquininas han sido las hormonas más ampliamente utilizadas y estudiadas en el contexto de la formación de callos y la posterior regeneración de órganos (Ikeuchi, *et al.*, 2013).

2.17.5 Inducción de callos *in vitro* mediante fitorreguladores

Las auxinas y las citocininas se han utilizado ampliamente para generación *in vitro* de callos en varias especies vegetales, pero sorprendentemente se sabe poco sobre cómo inducen los callos a nivel molecular. Varios estudios recientes demostraron que varios reguladores del desarrollo de la raíz participan en la formación de callos (Ikeuchi, *et al.*, 2013). La formación de callos o embriogénesis somática, es impulsada por hormonas vegetales como las auxinas, las citocininas y las giberelinas. La regeneración de plantas enteras a partir de tejido calloso se llama organogénesis o morfogénesis. Para este proceso, también se requieren fitorreguladores específicos. Los cultivos de callos pueden ser embriogénicos o no embriogénicos. Los cultivos de callos embriogénicos contienen células diferenciadas embriogénicamente competentes que regeneran plantas completas mientras que los callos no embriogénicos contienen células homogéneas, desdiferenciadas, que se utilizan para la producción de metabolitos secundarios (Efferth, 2019). En términos generales, una proporción intermedia de auxina y citocinina promueven la inducción de callos, mientras que una alta

proporción de auxina:citocinina y de citocinina:auxina induce la regeneración de raíces y de brotes respectivamente. Otras fitohormonas, como los brasinoesteroides o el ácido abscísico, también inducen callos y en algunas especies, pueden sustituir las auxinas o las citocininas en la formación de callos. Sin embargo, las auxinas y la citoquininas han sido las hormonas más ampliamente utilizadas y estudiadas en el contexto de la formación de callos y la posterior regeneración de órganos (Ikeuchi, *et al.*, 2013). Por otro lado, se pueden utilizar los cultivos celulares en suspensión para el cultivo en masa en biorreactores especialmente diseñados (Efferth, 2019).

2.18 Condiciones de cultivo

Los cultivos de callos no se desarrollan a partir de células individuales aisladas, sino a partir de tejidos estructurales heterogéneos. Sin embargo, los cultivos de callos son lo suficientemente homogéneos para permitir la micropropagación para la generación de copias idénticas de plantas con las características deseadas. Las condiciones de laboratorio para mantener los cultivos de callos difieren de una especie a otra, y deben desarrollarse en cada caso de manera particular. Los factores externos como la luz, la temperatura, el pH del medio y la aireación de los cultivos afectan la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los cultivos de callos pueden volver a diferenciarse en plantas enteras, si se mantiene bajo medios apropiados de crecimiento que difieren de los medios de cultivo estándar. Mientras que algunos cultivos de callos necesitan condiciones de crecimiento en oscuridad, otros crecen bajo condiciones de día-noche específicas (por ejemplo, 16 h de luz, 8 h oscuridad). Los cultivos de callos por lo general crecen a $(25 \pm 2^\circ\text{C})$. Estos se pueden distinguir entre los cultivos que crecen en una forma bastante compacta, y los que son friables. Los cultivos de callos friables se pueden utilizar para generar cultivos de una sola célula que se mantienen en medio líquido en agitación lenta. El cultivo de células vegetales representa un medio eficaz para la producción a gran escala haciendo uso de biorreactores para la producción de metabolitos secundarios terapéuticamente relevantes (Efferth, 2019).

2.18.1 Medios de cultivos.

Por lo general, los cultivos de callos se mantienen en medio de agar sólido suplementado con nutrientes específicos como sales, vitaminas y elementos (nitrógeno, fósforo y potasio). En general, las altas concentraciones de iones de amonio inhiben la formación de metabolitos secundarios, mientras que la disminución del nitrógeno del amonio aumenta. El fosfato inorgánico es esencial para la fotosíntesis y la glucólisis. Los altos niveles

de fosfato a menudo promueven el crecimiento celular y el metabolismo primario, mientras que las bajas concentraciones de fosfato favorecen la formación de metabolitos secundarios. Muchos metabolitos secundarios están formados por intermediarios fosforilados que posteriormente liberan el fosfato. Los ejemplos incluyen fenilpropanoides y terpenoides. (Efferth, 2019)

En general, la adición de precursores a los medios de cultivo mejora la formación del producto. La biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos de plantas suele ser baja y debe mejorarse para cumplir los fines científicos y comerciales. La adición de moléculas precursoras a los medios con frecuencia aumenta la formación de los metabolitos deseados. La biosíntesis de la mayoría de los metabolitos secundarios consiste en reacciones de varios pasos de varias enzimas. Cualquier paso de las reacciones en las cadenas de biosíntesis enzimáticas se puede estimular para mejorar la formación de los compuestos de interés (Efferth, 2019).

Los medios de cultivo típicos están bien establecidos como el medio Murashige & Skoog (MS), medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y el medio de White. En la mayoría de los casos antes mencionados, se deben agregar fitohormonas específicas al medio para estimular el crecimiento de callos. Para optimizar la producción de metabolitos secundarios es deseable utilizar dos tipos de dos medios: uno para un buen crecimiento celular y el otro para una buena producción de metabolitos secundarios (Efferth, 2019; Arana, 2013).

La aplicación biotecnológica de los cultivos de callos es que pueden usarse para la producción sostenible y a gran escala de metabolitos secundarios en productos farmacéuticos, alimentos cosméticos e industrias relacionadas. Los cultivos de callos de plantas medicinales producen fitoquímicos bioactivos que pueden usarse para tratar una amplia variedad de enfermedades (neurodegenerativas como EA, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, etc.). Por otro lado, metabolitos de interés se pueden extraer directamente de los callos sin sacrificar toda la planta a diferencia de los estudios fitoquímicos clásicos donde debe colectarse la planta nativa corriendo el riesgo de la devastación de las especies. Por esta razón, la tecnología de los callos puede ayudar a proteger especies de plantas raras y en peligro, además de que se pueden producir *in vitro* cantidades suficientes o incrementadas de metabolitos secundarios. Los cultivos de callos también se pueden convertir en cultivos de suspensión de células individuales usando matraces en agitación o biorreactores

para producir los metabolitos secundarios deseados. Esto permite el crecimiento en condiciones controladas sin la influencia de factores ambientales variables, enfermedades microbianas de variación estacional, plagas y limitaciones geográficas. Por lo tanto, se pueden producir metabolitos secundarios eficientemente de manera constante (Efferth, 2019).

2.18.2 Extractos de metabolitos bioactivos producidos *in vitro*

Las técnicas químicas utilizadas para aislar y purificar metabolitos secundarios son las mismas en cultivos de células vegetales y plantas enteras. Si los productos generados se liberan en el medio de cultivo, su separación es fácil. Si se almacenan dentro de las vacuolas el tonoplasto, y las membranas plasmáticas de las células vegetales tienen que ser interrumpidas (por agentes permeabilizantes como el dimetilsulfóxido). Además de numerosos informes sobre la producción de compuestos bioactivos mediante cultivos de callos, se han demostrado resultados en los que los extractos preparados a partir de cultivos de callos realizan actividades farmacológicamente interesantes. (Efferth, 2019).

2.19 Cultivo *in vitro* de Pteridofitas

Se han realizado trabajos de cultivo *in vitro* de pteridofitas por mencionar algunos géneros como *Polypodium*, *Pleopeltis* (Polypodaceae), y en algunos otros géneros de la familia Gleicheniaceae entre otros. Se han desarrollado cultivos para la germinación de esporas con el objetivo de la obtención y desarrollo de gametofitos. Jaramillo & Pérez en 1994 realizaron cultivo *in vitro* de *Polypodium* para la germinación de esporas generando prótalos y gametofitos. En este estudio indicaron que la formación de los prótalos depende de varios factores como la concentración de los nutrientes, densidad de siembra del cultivo, cantidad y calidad de luz. También resaltan que el éxito de la germinación de las esporas depende de un medio de cultivo adecuado. En especies vegetales de *Pleopeltis* (polypodaceae) se ha realizado cultivo *in vitro* para el desarrollo de gametofitos, se ha encontrado que son escasos este tipo de trabajos debido a la duración del periodo de germinación y la formación de los prótalos (Jaramillo *et al.*, 2003). De igual manera en otro estudio en especies de la familia Gleicheniaceae realizaron cultivo *in vitro* en medio Agar Thompson para la germinación de esporas y su posterior formación de gametofitos en esta investigación mencionan que son escasos los estudios de este tipo (Farfan *et al.* 2017). Es importante mencionar que en todos estos trabajos no muestran un tratamiento de desinfección de las esporas debido a que estas fueron vertidas a los medios de cultivo sin ningún tipo de esterilización, la razón a esto es que los medios de cultivo carecen de sacarosa por lo que la contaminación es casi nula.

2.19.1 Cultivo *in vitro* de especies de *Lycopodium*

Atname *et al* en el 2000 realizaron la inducción de la callogénesis nodular para la propagación de *Lycopodiella inundata*, una especie vegetal en peligro de extinción la cual produce alcaloides de importancia farmacéutica. En este trabajo micropropagaron *L. inundata*, de inicio no obtuvieron la germinación de esporas axénicas, por lo que eligieron fragmentos del esporofito como explante. Usaron 5 medios de cultivo para la inducción a callogénesis, los medios fueron MS (Murashige & Skoog) completos y a la mitad. Usaron fitorreguladores como IBA (ácido indolbutírico), KIN (cinetina) y GA₃ (ácido giberélico); 20 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar y un pH a 5.4. Los fitorreguladores fueron adicionados y esterilizados en autoclave 20 min 120°C y usaron fotoperiodo de 12h. Indujeron la callogénesis a las 13 semanas en el medio CM-5. Es importante mencionar que en esta pesquisa no indicaron el método de esterilización del material vegetal, lo refieren en Atname 1999 (tesis no disponible en francés). Otro punto importante es que adicionan los fitorreguladores antes de esterilizar en la autoclave, tomando en cuenta que existen fitorreguladores termolábiles.

2.19.2 Cultivo *in vitro* de *Huperzia* y *Phlegmariurus*

Whittier en 1998 realizó la germinación de esporas de especies de Lycopodiaceae donde hizo referencia que la germinación de las esporas en cultivo axénico es difícil y que generalmente se lleva un tiempo considerable lograrlo además de que el porcentaje de germinación es bajo. Mencionó que se han llevado a cabo intentos más recientes para germinar estas esporas en cultivo axénico pero menos del 0.1% de las esporas germinan. También encontraron que las esporas de *Lycopodium cernuum* fueron más lentas para comenzar a germinar en cultivos axénicos, haciendo referencia que probablemente se debía a que el medio nutritivo contenía solo el 2% de glucosa. Debido a problemas con la germinación de esporas en cultivos axénicos y de suelo, este estudio se inició en un esfuerzo por comprender y mejorar la germinación en esta especie vegetal. Este mismo autor en el 2006, realizó el cultivo *in vitro* de gametofitos de 4 especies de *Huperzia*, (*H. crassa*, *H. cumingii*, *H. hypogaea* y *H. saururus*). Encontró que el cultivo axénico de gametofitos subterráneos de esta familia se puede cultivar en medios nutritivos enriquecidos con minerales y azúcar (Whittier, 2006). Debido a que se conocen los gametofitos de muy pocas especies de Lycopodiaceae, recalcó que se necesita más información para proporcionar una mejor

comprensión de los gametofitos de esta familia indicando que el cultivo axénico crea la oportunidad de estudiar los gametofitos no descritos para posteriores investigaciones. En este estudio se describió por primera vez los gametofitos de cuatro especies de *Huperzia*. (Whittier, 2006). Se encontró que las esporas germinadas y los gametofitos jóvenes crecieron en 14 ml de medio nutritivo en tubos de cultivo (20x125 mm) con tapones de rosca apretados para reducir la pérdida de humedad. También indican que los cultivos fueron mantenidos a 22 + 1 °C y que hasta nueve meses después los gametofitos jóvenes fueron transferidos a un medio nutritivo fresco y crecidos hasta la madurez. Otro dato es que los gametofitos fueron mantenidos en oscuridad. Por último los gametofitos maduros fueron obtenidos hasta 2-3 años después de sembrar las esporas (Whittier, 2006). Es relevante recalcar que en este estudio no se muestran las condiciones para obtención de cultivos axénicos ni los medios de cultivo de forma completa refiriendo la información en Whittier 1998. Al revisar esa referencia la formulación del medio de cultivo sigue aún incompleta, debido a que no se indica la composición de algunos elementos, adicionalmente no es clara la esterilización de las esporas ya que es referido como el método de Whittier en 1964. Este método de esterilización indica que las esporas se humedecieron con una solución de Tween 80 al 0,1% y fueron expuestas a una solución de Clorox al 15% durante dos minutos para esterilizarlas. No es claro el tiempo de exposición al Tween 80, ni en general cuantos lavados se realizaron.

En otro estudio de Whittier y Storchova en 2007, realizaron cultivo *in vitro* de *Huperzia selago* en condiciones axénicas no claras según el método de esterilización de Whittier (1964). En esta ocasión las esporas fueron suspendidas en agua estéril previo a la siembra y usaron un fotoperiodo de 12h. La composición del medio de cultivo aún sigue siendo poco claro, además de que en esta ocasión variaron la cantidad de glucosa (5g) y de agar (1.1%). En esta ocasión es importante recalcar que el pH de 5.9 a diferencia de los otros estudios se ajustó antes de esterilizar en el autoclave (Whittier & Storchova 2007). En este estudio no se muestran las condiciones para obtención de cultivos axénicos lo refieren nuevamente como método de Whittier (1964) ni tampoco exhiben los medios de cultivo de forma completa (indicados en Whittier, 1998) (Whittier, 2006).

En otras publicaciones de *Huperzia*, se ha demostrado que *H. serrata* posee un contenido muy bajo de HupA (aproximadamente 0.007%), además de ser una planta de crecimiento muy lento. Como se ha mencionado anteriormente se necesitan al menos 15 años desde la germinación de esporas hasta la etapa de gametofito para llegar finalmente al

esporofito maduro. Por otro lado, la concentración promedio de HupA en las especies de *Phlegmariurus* fue de 357.44 µg / g (Ma *et al.*, 2005), sin embargo, las especies de *Phlegmariurus* no son abundantes y solo se encuentran en hábitats muy especializados. Dado alta abundancia de HupA en estas plantas pequeñas, la escasa distribución y la alta demanda de HupA pronto conducirá a la destrucción de las poblaciones silvestres de *Phlegmariurus*, *Huperzias* y especies relacionadas (Ma, *et al.*, 2004). Aunque *Phlegmariurus squarrosus* puede propagarse dentro de un período de seis meses a un año de cultivo *in vitro* (Ma *et al.*, 2006), la cantidad de HupA todavía no puede satisfacer las necesidades de los productos farmacéuticos en la industria (Zhang *et al.*, 2015).

Debido a estas tendencias, la propagación *in vitro* de material vegetal que produce HupA ha despertado un interés generalizado en los últimos años. Desafortunadamente, los esfuerzos en esta área han tenido un éxito limitado (Atmane *et al.*, 2000; Whittier & Storchova, 2007; Whittier, 1998; Whittier & Webster, 1986). En contraste, Szypuła *et al.* midieron el contenido de HupA en plantas mantenidas *in vitro* (Szypuła *et al.*, 2005) y en otro hallazgo Ma y Gang lograron propagar *in vitro* el tejido *Phlegmariurus squarrosus* y detectar HupA mayormente producida en este tipo de cultivos que por la planta nativa (Ma y Gang, 2008).

La sobreexplotación de estas plantas silvestres con fines comerciales y las difíciles condiciones de cultivo han hecho que especies de *Huperzia*, *Phlegmariurus* y especies relacionadas estén en peligro de extinción. Por lo tanto, el cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado para propagar especies de *Huperzia* y *Phlegmariurus* (Ma y Gang, 2008). Yang *et al.* en 2008 y Liang en 2010 establecieron el sistema de cultivo de tejidos de *H. serrata* seleccionando puntas de brotes como explantes. Yang *et al.* (2010) adoptaron ramas de *H. serrata* para establecer su técnica de propagación de corte por separado. A pesar de tales esfuerzos, todavía existen muchos problemas en el trasplante y la adaptación de *H. serrata* (Bao *et al.*, 2012).

Por otro lado, como se había mencionado antes, las especies del género *Phlegmariurus* todavía parecen poseer niveles más altos de HupA que las especies del género *Huperzia*. Aunque producen grandes cantidades de HupA, estas especies son más difíciles de obtener, además de ser más escasas que *H. serrata*. Con el objetivo de superar el bajo contenido de HupA en estas especies vegetales, Ma y Gang (2008) desarrollaron un método para propagar tejidos *in vitro* de *Phlegmariurus squarrosus*, un miembro de la familia

Lycopodaceae (antes Huperziaceae) que produce altos niveles de HupA. Los autores mencionaron que los callos producidos *in vitro* pueden representar una excelente fuente de HupA (Ma y Gang 2008; Ferreira *et al.*, 2014).

En este estudio Ma y Gang en el 2008 realizaron el cultivo *in vitro* de *Phlegmariurus squarrosus* donde desarrollaron un método para la propagación tejidos *in vitro* de *P. squarrosus*, un miembro de Lycopodaceae (antes Huperziaceae), que producen altos niveles de HupA. En esa investigación mencionan que los tejidos propagados *in vitro* producen niveles aún más altos de HupA que la planta natural, siendo una relevante fuente de HupA. En esta publicación llevaron a cabo el cultivo *in vitro* e inducción a callogénesis de esta especie donde utilizaron fitoreguladores como AIA, ANA y Zeatina. Adicionalmente analizaron el efecto de la temperatura y el pH. En este sentido demuestran los medios efectivos que condujeron a la generación de los callos productores de HupA de manera exitosa, sin embargo el no muestran el método para la obtención de cultivos axénicos.

En otra investigación más reciente de Szypluła *et al* en el 2013, presentan un protocolo para el cultivo axénico *in vitro* rápido y efectivo de esporófitos de *Huperzia selago* (fuente de HupA). Establecieron los cultivos utilizando propágulos vegetativos obtenidos de esporófitos que crecen en la naturaleza sin devastar los hábitats de esta especie vegetal en peligro de extinción. Los explantes fueron sometidos a desinfección superficial e interna para eliminar las bacterias y hongos epífitos y endofíticos. En cultivos *in vitro*, lograron resultados óptimos usando medio Moore (Mr) sin reguladores de crecimiento, y los medios fueron suplementados con IBA y cinetina, asegurando tanto la viabilidad de los propágulos como su desarrollo posterior. El índice de crecimiento de la biomasa para esporófitos de *H. selago* fue a partir de propágulos, producidos a los 3 meses de cultivo. Se observó un crecimiento vigoroso de raíces adventicias, especialmente en medio Mr y con la adición de ANA lograron la formación de callos en los ápices de los brotes. Es sumamente importante mencionar que en este trabajo para el protocolo de desinfección utilizaron agentes desinfectantes como Tween®20 y PPM (Plant Preservative Mixture™).

3. JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto contribuye al desarrollo de nuevos agentes con potencial aplicación terapéutica en la enfermedad del Alzheimer a partir de la investigación fitoquímica, farmacológica y la manipulación biotecnológica de *Phlegmariurus taxifolius*, especie vegetal productora del anticolinesterásico huperzina A (HupA), lo que incrementa las alternativas existentes para el manejo de los recursos naturales en México. Es importante mencionar que la planta *P. taxifolius* carece de estudios fitoquímicos, biológicos y farmacológicos. Por esta razón es primordial realizar estudios de esta especie vegetal.

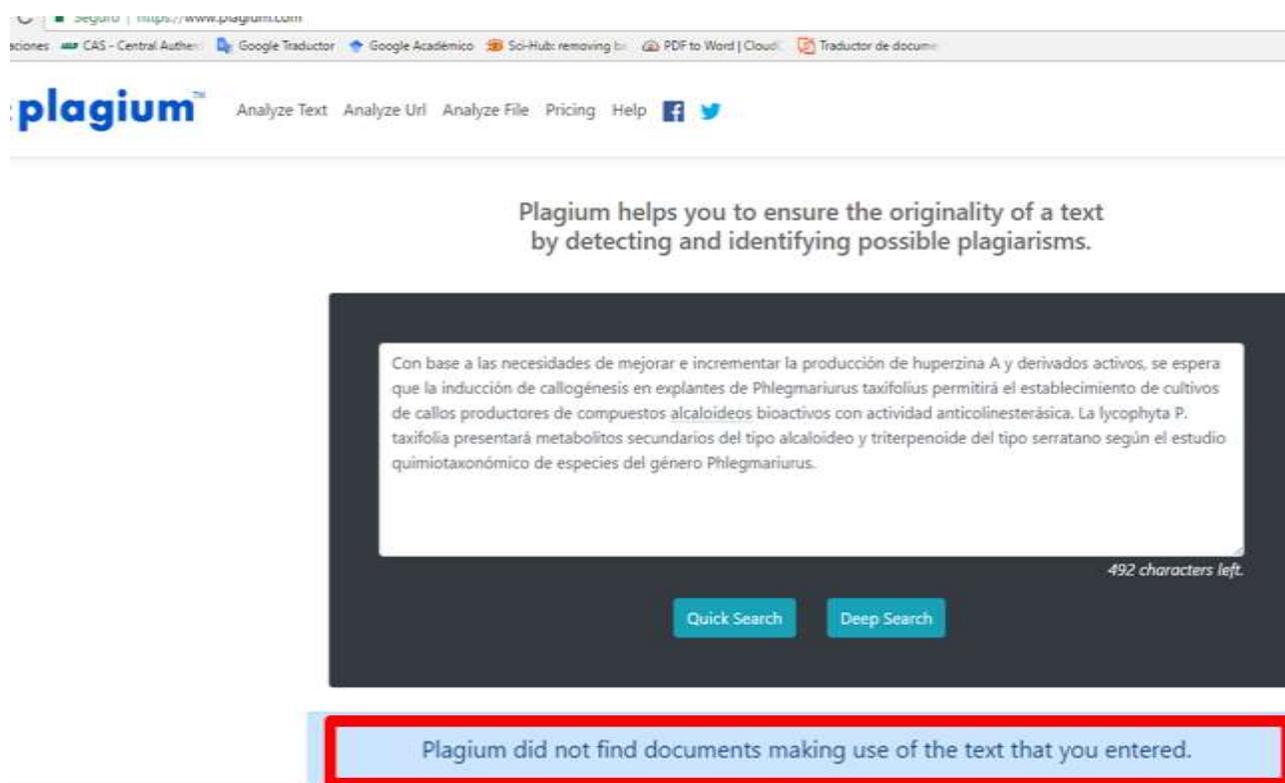
Aunado a lo anterior, el crecimiento lento de *P. taxifolius* y la necesidad de hábitats especializados, además de la baja concentración de HupA, son elementos que se pueden superar a través de estrategias biotecnológicas como lo es la inducción de callogénesis y su micropropagación. Debido a esto, el beneficio de usar este tipo de células desdiferenciadas es que tienen una velocidad de crecimiento mucho mayor y controlada que la planta silvestre, ya que la misma puede tardar cerca de 15 años en crecer, por lo que este sistema biotecnológico *in vitro* ofrece ventajas para la producción del alcaloide HupA.

Es importante señalar que existen pocos trabajos sobre la inducción a callogénesis y su cultivo *in vitro* en plantas de este género, debido a que es un evento sumamente difícil de conseguir en plantas inferiores de este tipo. Esto es debido a que estas plantas, en comparación con las plantas superiores, no muestran respuesta de la misma manera a distintos fitorreguladores, presentando oxidación de los explantes y nulo crecimiento. Al igual que lo anterior, existen pocos trabajos que logran la desinfección de este tipo de plantas, lo que limita continuar con la inducción de callogénesis y su posterior cultivo *in vitro*. Se ha demostrado que la desinfección para la obtención de explantes axénicos es un proceso difícil de conseguir, debido a la baja sensibilidad a los agentes desinfectantes usados, siendo muy común la contaminación fúngica y bacteriana además de su nulo crecimiento. Aunado a lo anterior, *P. taxifolius* se encuentra en peligro vulnerable de extinción, por tal razón la biotecnología vegetal es una alternativa prometedora para la conservación de las especies de este género y el mejoramiento de su rendimiento alcaloideo.

4. HIPÓTESIS

Con base a las necesidades de mejorar e incrementar la producción de huperzina A y derivados activos, se espera que la inducción de callogénesis en explantes de *Phlegmariurus taxifolius* permitirá el establecimiento de cultivos de callos productores de compuestos alcaloideos bioactivos con actividad anticolinesterásica. La lycophyta *P. taxifolius* presentará metabolitos secundarios del tipo alcaloideo y triterpenoide del tipo serratano según el estudio quimiotaxonómico de especies del género *Phlegmariurus*.

<https://www.plagium.com/>



plagium™ Analyze Text Analyze Url Analyze File Pricing Help

Plagium helps you to ensure the originality of a text by detecting and identifying possible plagiarisms.

Con base a las necesidades de mejorar e incrementar la producción de huperzina A y derivados activos, se espera que la inducción de callogénesis en explantes de *Phlegmariurus taxifolius* permitirá el establecimiento de cultivos de callos productores de compuestos alcaloideos bioactivos con actividad anticolinesterásica. La lycophyta *P. taxifolia* presentará metabolitos secundarios del tipo alcaloideo y triterpenoide del tipo serratano según el estudio quimiotaxonómico de especies del género *Phlegmariurus*.

492 characters left.

Quick Search Deep Search

Plagium did not find documents making use of the text that you entered.

<http://plagiarisma.net/es/>

100% Único

Total 508 caracteres , 68 palabras, 2 frases únicas.

Ensayo en inglés - Servicio de escritura de papel que usted puede confiar. ¡Su asignación es nuestra prioridad! ¡Papeles listos en 3 horas! Escritura domina: top escritores académicos a su servicio 24/7! ¡Recibir un documento de nivel premium!

Resultados	Consulta	Dominios (enlaces originales)
Único	derivados activos, se espera que la inducción de callogénesis en explantes de <i>Phlegmariurus taxifolius</i> permitirá	-
Único	taxifolia presentará metabolitos secundarios del tipo alcaloideo y triterpenoide del tipo serratano según el	-

5. OBJETIVOS

5.1 General

Establecer las condiciones axénicas para el cultivo *in vitro* e inducción a calogénesis a partir de los explantes derivados de los frondes vegetales de *P. taxifolius* productora del alcaloide anticolinesterásico huperzina A.

5.2 Particulares

- * Aislar e identificar huperzina A y derivados activos de los frondes de *P. taxifolius*.
- * Establecer el protocolo de desinfección para la obtención de los explantes axénicos de *P. taxifolius*.
- * Seleccionar un medio de cultivo idóneo determinando la composición del medio y sus condiciones de pH.
- * Diseñar un experimento para la selección y combinación de distintos fitorreguladores para la inducción a calogénesis.
- * Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* como temperatura y luminosidad.
- * Realizar el cultivo *in vitro* de la planta *P. taxifolius* e inducir la calogénesis.
- * Determinar la viabilidad celular de los callos de *P. taxifolius* mediante microscopía de Fluorescencia.
- * Establecer una línea productora de huperzina A y sus condiciones de cultivo.
- * Aislar y purificar los compuestos(s) bioactivo(s) presente(s) en la planta seleccionada mediante el empleo de las técnicas cromatográficas.
- * Caracterizar la estructura molecular de los metabolitos presentes en la planta mediante métodos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos.
- * Realizar el estudio fitoquímico de extractos de *P. taxifolius* para la identificación de compuestos de interés.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta del Material vegetal

El material vegetal experimental fue obtenido en el mercado del municipio de Coatepec, Veracruz, y procesado en el Laboratorio de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM. La planta fue identificada y depositada en el Herbario HUMO de la UAEM con el número de voucher 39243. El siguiente esquema resume el proceso de la preparación del material vegetal, como el secado, trituración y maceración.

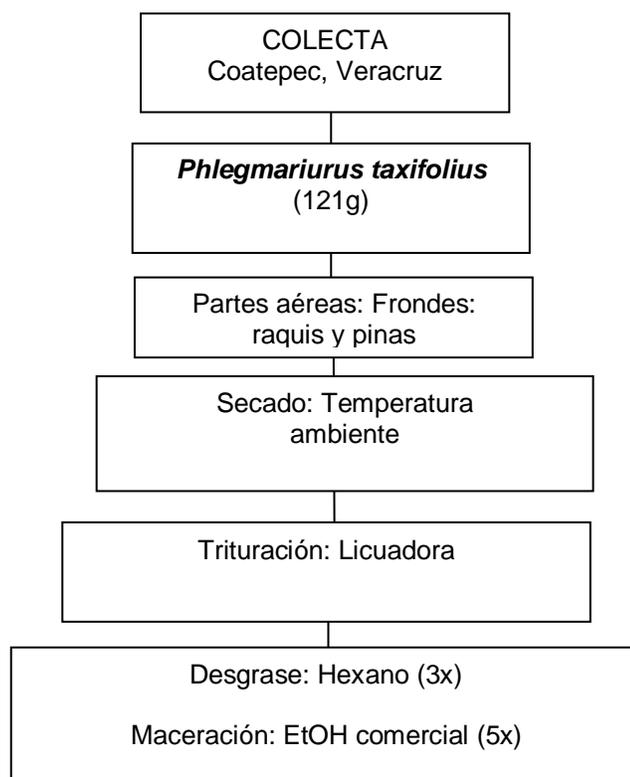


Figura 6.1. Procesamiento de los frondes de *P. taxifolius*.

6.1.1 Preparación de los extractos

Se utilizaron los frondes de *P. taxifolius*, las cuales fueron procesadas mediante secado a temperatura ambiente, trituración y maceración (figura6.1). El material vegetal seco triturado se desgrasó con hexano y se sometió a una maceración en metanol y sonicación (5 veces).

Se usó un evaporador rotatorio (Büchi B-480, 40°C) mediante presión reducida para la obtención del extracto crudo.

6.2 Análisis fitoquímico para la presencia de alcaloides

El extracto crudo metanólico de *P. taxifolius* fue investigado en cuanto a la presencia de alcaloides mediante reacciones de coloración con el reactivo de Dragendorff y Wagner y Mayer (Harborne, 1973; Stahl, 1973; Domínguez, 1979; Wagner *et al.*, 1984). Estos reactivos se prepararon de la siguiente manera:

Reactivo de Wagner: Solución de yodo en yoduro de potasio. Disolución 1.27 g yodo, 2 g yoduro de potasio en 5 mL de H₂O, aforo a 100 mL H₂O.

Reactivo de Dragendorff: *Solución A:* Disolución 1.7 g nitrato de bismuto (III), 20 g ácido tartárico en 80 mL de H₂O. *Solución B:* Disolución 16 g yoduro de potasio en 40 mL H₂O. *Solución stock:* Mezcla A:B 1:1 (v/v).

Reactivo de Mayer: Disolución 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio, aforo a 100 mL.

6.3 Obtención del extracto total de alcaloides

Se realizó una extracción ácido-base para la obtención de los alcaloides totales (figura.6.2). El extracto crudo metanólico fue retomado en solución acuosa de HCl 0.5 M (pH~ 5) cinco veces para la obtención de alcaloides en la forma de clorhidrato. En seguida, los extractos ácidos se lavaron con cloroformo. Las fases acuosas, se alcalinizaron con NH₄OH (pH~ 9), y se extrajeron exhaustivamente con cloroformo. Para este procedimiento se realizaron cinco extracciones en cada etapa para la obtención de alcaloides totales. Los extractos orgánicos resultantes fueron concentrados a sequedad para la obtención del extracto crudo de alcaloides totales, según metodología previamente descrita para la identificación de la huperzina A en plantas de la misma familia (Wu & Gu, 2006).

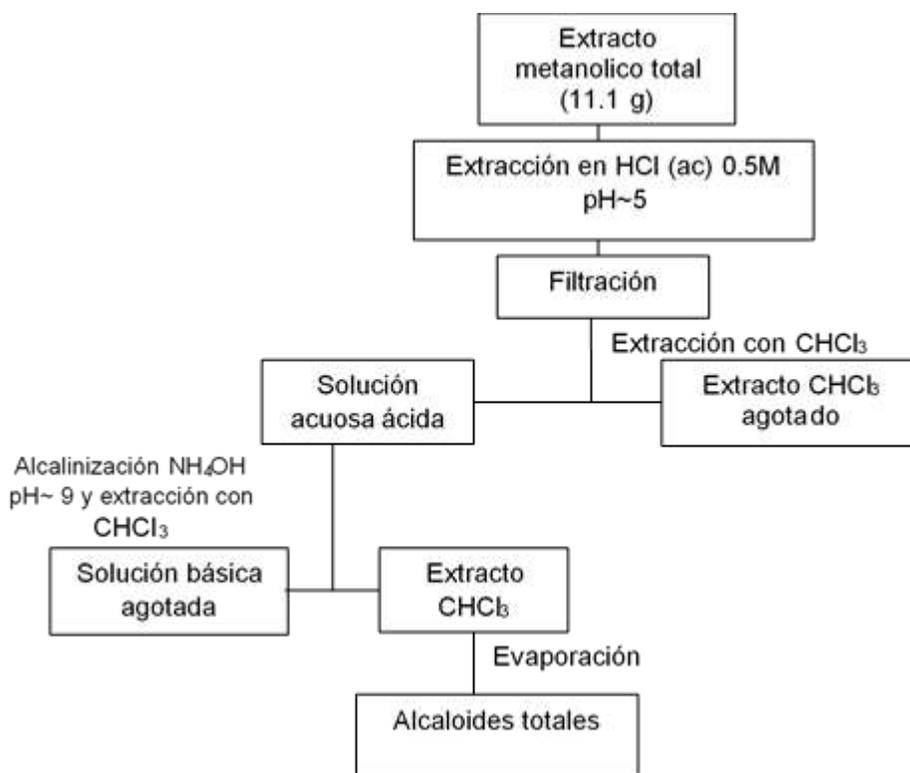


Figura 6.2. Esquema de la extracción acido-base de alcaloides totales de los frondes de *P. taxifolius*.

6.4 Aislamiento y purificación de los alcaloides y de los compuestos de interés

Los extractos crudos de los alcaloides totales se sometieron a una serie de separaciones mediante cromatografía en columna abierta (CCA). Como fase estacionaria se usó fase normal sílica gel y en algunos casos fase reversa C-18. Para la fase móvil se usaron varios sistemas de elución. En el primer fraccionamiento (CCA1) se usó un sistema de elución usando CHCl_3 : MeOH: H_2O 7:1:0.1 – 5:1:0.1. Se obtuvieron 14 fracciones de las cuales, según sus rendimientos y su perfil químico, varias fracciones se sometieron a su posterior separación y purificación. Se realizaron varios seguimientos fitoquímicos para la obtención de 3 compuestos puros (T1, T2 y T3) los cuales se propusieron para estudios de RMN protónica y de carbono 13.

6.4.1. Purificación del compuesto T1

Para la purificación de T1 se partió de las fracciones 3 y 4 de la CCA1, las cuales conllevaron a 4 subsecuentes separaciones cromatograficas mediante columna abierta (CCA2-CCA5) usando como fase estacionaria una fase normal, silica gel y diversos sistemas de elución (figura6.3)

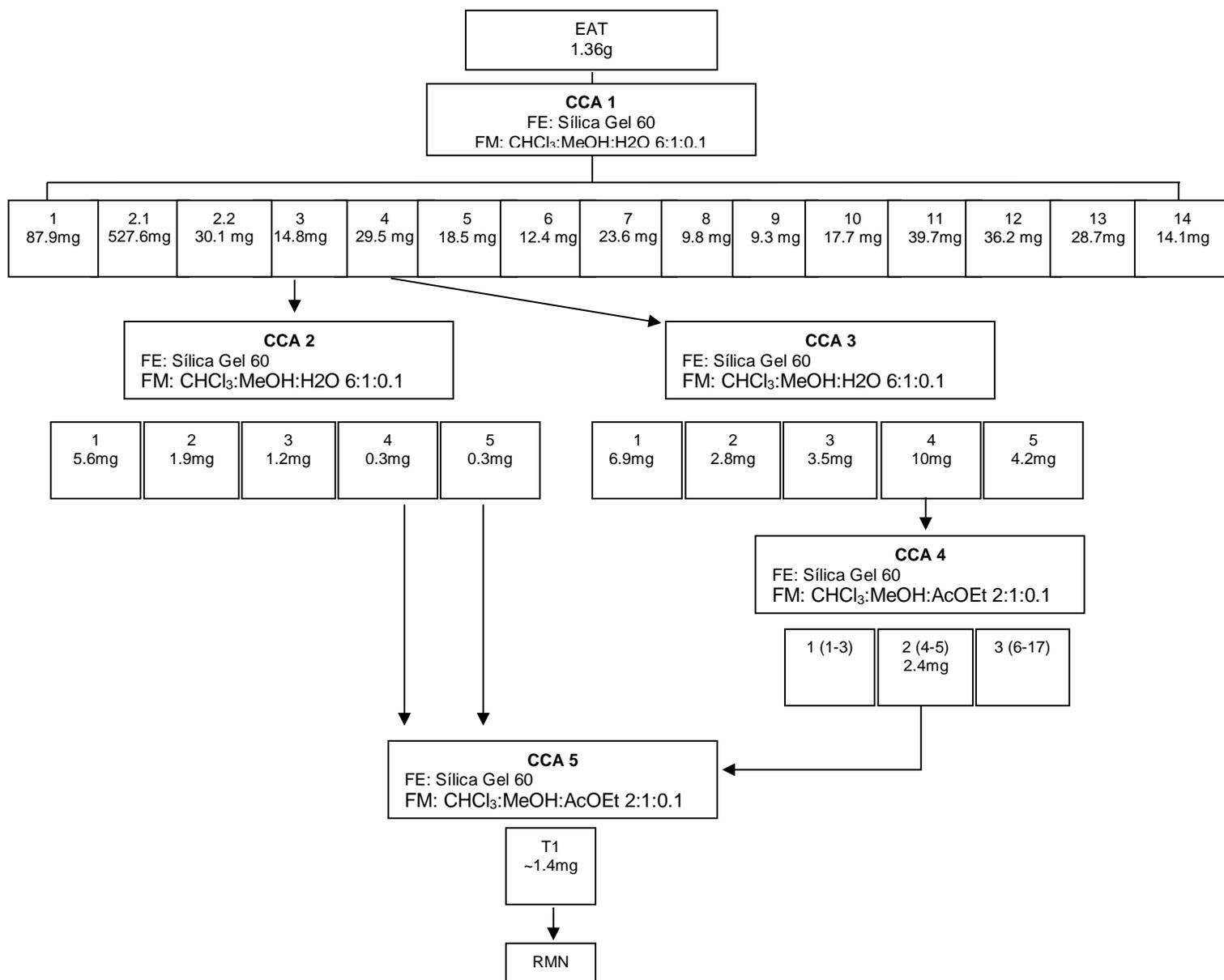


Figura 6.3. Esquema general de las CCA1-CCA5 de *P. taxifolius* para la purificación del compuesto T1; FE: sílica gel 60 en CCA1-CCA5. FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1-CCA3, FM: CHCl₃:MeOH:AcOEt 2:1:0.1 en CCA4- CCA5.

6.4.2. Purificación de los compuestos T2 y T3

La fracción 2.1 se eligió debido a que presenta un factor de retención similar al de la huperzina A, por esto se realizaron 3 separaciones cromatograficas por columna abierta (CCA6, CCA7 y CCA8), para la purificación del compuesto T2 (figura 6.4). Para la obtención del compuesto T3 se partió de la subfracción 2 de la CCA6 la cual se sometió a la CCA9 en la cual finalmente se purificó el compuesto T3.

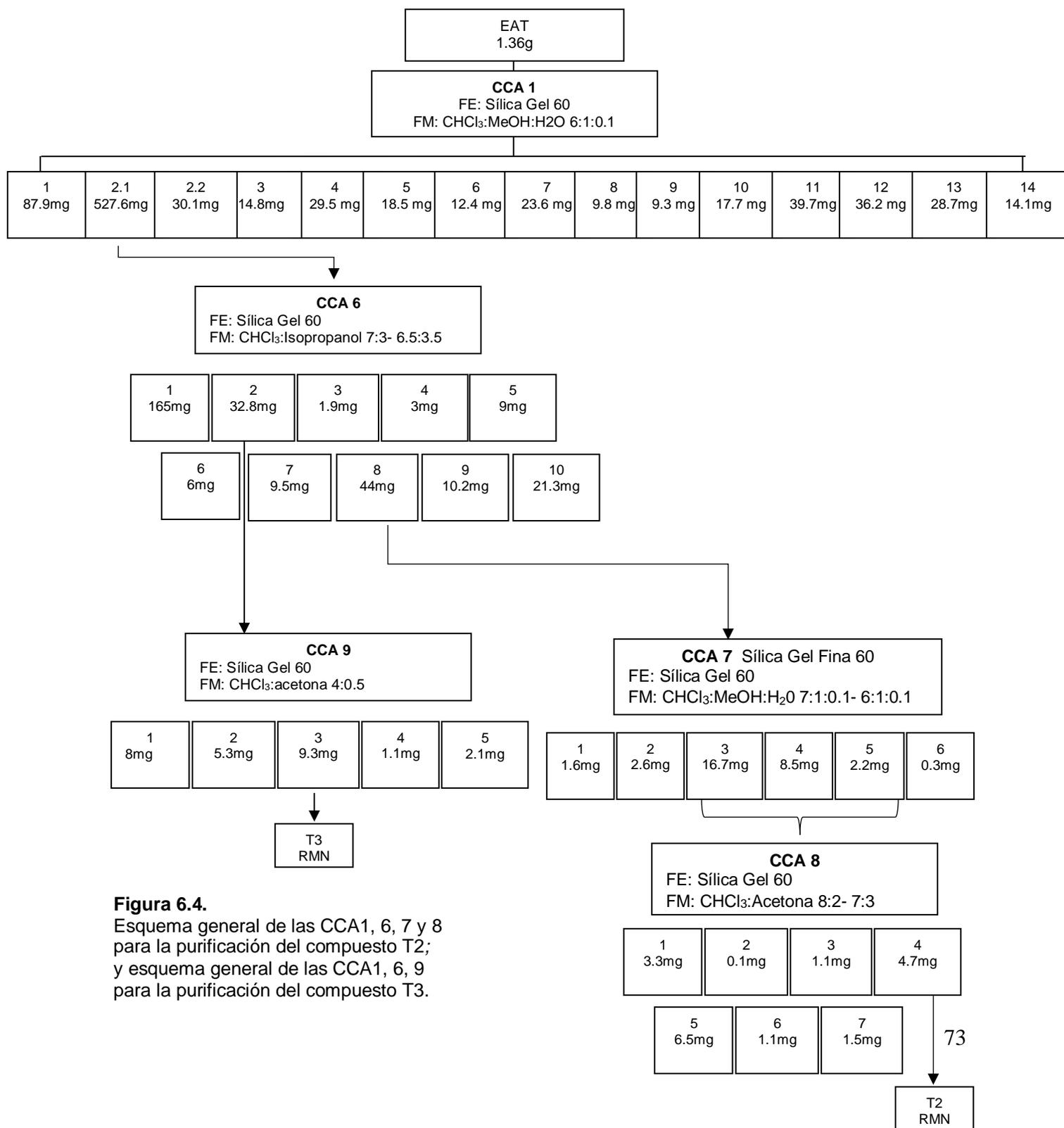


Figura 6.4. Esquema general de las CCA1, 6, 7 y 8 para la purificación del compuesto T2; y esquema general de las CCA1, 6, 9 para la purificación del compuesto T3.

6.4.3. CCA 10 y CCA11

Se realizaron las CCA10 y la CCA11 para la separación de los alcaloides de interés de las fracciones 11 y 13 (CCA1). En la CCA10 se obtuvieron 5 subfracciones y en la CCA11 9 subfracciones. Se usaron diversos sistemas de elución como se detalla en la figura 6.5.

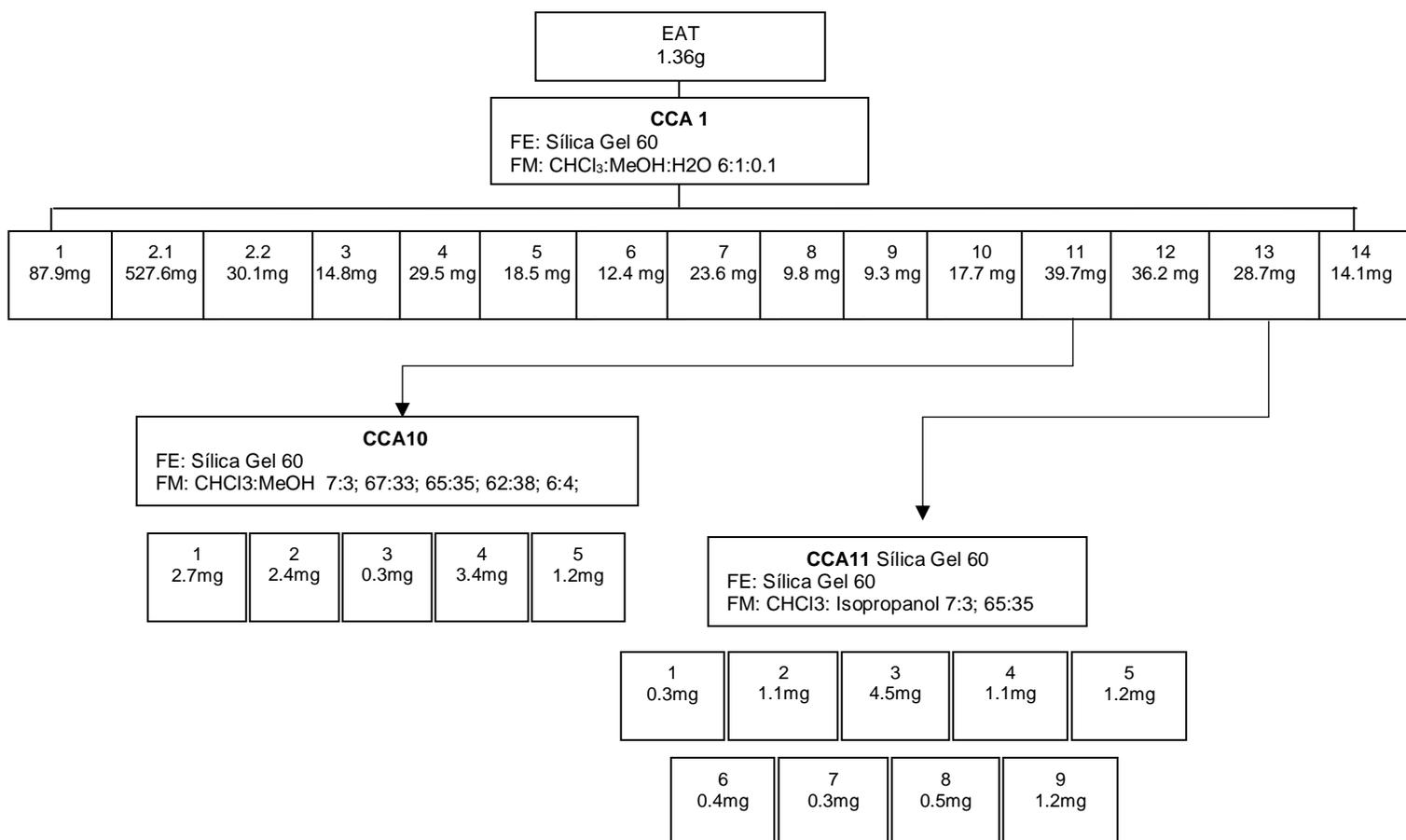


Figura 6.5. Esquema general de las CCA1, CCA8 y CCA11, a partir de la fracción 2.1 de la CCA1 (EAT de *P. taxifolius*); FE: sílica gel 60 en CCA1, CCA8 y CCA11. FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1, FM: CHCl₃:MeOH 7:3; 67:33; 65:35; 62:38; 6:4 en CCA8; FM: CHCl₃: Isopropanol 7:3; 65:35 en CCA11

6.5 Identificación y elucidación estructural

La identificación de los productos aislados se realizó a través de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-H¹), y de Carbono (RMN-C¹³). Se propusieron ser evaluados los compuestos puros T1 (CCA5) y T2 (CCA8) y T3 (CCA9).

6.6 Evaluación de la Actividad Anticolinesterásica

Se realizó el ensayo *in vitro* para la determinación de la actividad anticolinesterásica. Esta actividad fue determinada a través del método colorimétrico descrito por Ellman *et al.* (1961). Se empleó la acetiltiocolina (0.08 mM) como sustrato de la enzima. La actividad se evaluó *in vitro* mediante incubación durante 30min con la enzima obtenida de la corteza cerebral de ratas con diferentes concentraciones de los extractos de alcaloides. Las muestras fueron incubadas con el reactivo de Ellman DNTB 10mM (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) y, para registro del blanco se adicionó el sustrato de la enzima, la acetiltiocolina. El porcentaje de inhibición de la enzima se calculó a través de la comparación de valores obtenidos con la incubación con DMSO 1% (control).

6.7 Cultivo *in vitro* de *P. taxifolius*

6.7.1 Desinfección de *P. taxifolius* para obtención de explantes axénicos

Prelavado 1: Los frondes de *P. taxifolius* fueron previamente enjuagados en la tarja con abundante agua corriente para eliminar restos de tierra y sustrato presentes en la planta en el momento de su colecta.

Prelavado 2: Primero los frondes fueron enjuagados con abundante agua de grifo y después fueron lavados con detergente comercial. En este procedimiento los frondes se lavaron con jabón líquido (axion tricloro®) agregando cantidad suficiente para generar espuma, lográndose así la eliminación completa de los restos de materia externa como tierra y contaminantes. Posteriormente se realizó un enjuague con abundante agua corriente para remover por completo cualquier residuo de jabón. Finalmente, se realizaron varios enjuagues (3-5) con agua destilada estéril para continuar con los tratamientos de desinfección (Tabla 6.1 y 6.2).

6.7.2. Preparación / Selección de explantes

Para llevar a cabo el protocolo de desinfección, fue rigurosamente necesario que los explantes de *P. taxifolius* fueran sometidos al prelavado 1 ó 2 para la obtención de explantes axénicos para su posterior inducción a callogénesis (tablas 6.1 y 6.2). En condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar se realizaron cortes de los tallos (raquis) de los frondes con aproximadamente 1cm x 0.5cm de longitud. Los explantes fueron puestos en contacto con diferentes agentes desinfectantes (tablas 6.1 y 6.2) en diversas concentraciones y en tiempos definidos hasta determinar el mejor tratamiento en el cual presentara nula contaminación de los explantes. Para la estandarización del protocolo de Desinfección (tratamientos 28-43) se hicieron cortes de los explantes con epidermis y sin epidermis, los cuales fueron evaluados

para determinar el mejor tratamiento de desinfección con estas condiciones. Los explantes axenicos que no presentaron ningún tipo de contaminación fueron seleccionados para la inducción a callogénesis.

6.7.3. Protocolo de Desinfección

Para la obtención de los explantes axénicos se realizó la desinfección de *P. taxifolius* mediante distintos tratamientos (Tabla 6.2), con la utilización de diferentes agentes desinfectantes (AD), selección de las concentraciones y tiempos de lavado. Los tratamientos de desinfección constaron de un prelavado (prelavado 1 o 2) y en todos los casos se trató de un protocolo de desinfección de 2 o más pasos con diversos desinfectantes (tablas 6.1 y 6.2) este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, la cual previamente fue puesta en exposición de luz UV durante 15 minutos y esterilizada con etanol al 70% y antibenzil al 5%.

Tratamientos del 1-15: Se realizó el prelavado 1 en todos los tratamientos y se usaron diversos agentes como microdyn, Cloro, benomilo (BEN, antifúngico) y gentamicina (GEN, antibiótico) (tabla 6.1).

Tratamientos del 16-27: Se realizó el prelavado 2 en todos los tratamientos y se inició el uso de un novedoso desinfectante denominado PPM (Plant Preservative Mixture ®). Se trató de una serie de 3 lavados, usando etanol al 70%, el desinfectante PPM a diferentes concentraciones y finalmente se realizaron enjuagues con agua destilada (H₂O_d) estéril respectivamente (tabla 6.1).

6.7.3.1. Estandarización del Protocolo de Desinfección

Tratamientos del 28-43: Se estandarizó el protocolo de desinfección realizando en todos los casos el Prelavado 2. Se trató de una serie de 3 lavados homogenizando las condiciones del lavado 1 y 2. Para todos los tratamientos se usó en lavado 1 Tween 20 al 0.1% y en el lavado 2 etanol al 70%. En el lavado 3 se empleó el PPM como agente desinfectante en diferentes concentraciones (1, 2, 5 y 10%) homogenizando el tiempo de lavado en agitación constante (1 hora a **100 rpm**). Adicionalmente fue agregado el PPM (0.5, 1, y 2%) en los medios de cultivo B5 (tratamientos 32-43) y se usó como blanco los medios B5 sin PPM (tratamientos 28-31). Para todos los casos al final se secó el exceso de PPM en papel absorbente estéril.

En todos los tratamientos (1-43) los explantes fueron puestos en medios de cultivo B5 estándar (Gamborg *et al.*, 1968) + 30 g/L sacarosa, 3.4 g fitagel, 3 g PVP y se ajustó el pH a 5.8, sin reguladores de crecimiento los cuales fueron adicionados hasta la obtención de cultivos

axenicos. Para el caso del protocolo estandarizado (tabla 6.2) los tratamientos 28-31 fueron preparados sin ningún tipo de deinfectante mientras que en los tratamientos 32-43 se adicionó el PPM a los medios de cultivo B5 a diferentes concentraciones (0.5, 1 y 2%) para poder realizar la comparación de resultados.

Como se mencionó en la preparación de los explantes (6.7.2) en experimentos adicionales los explantes obtenidos de los tallos (raquis) de la planta fueron sometidos a los tratamientos de desinfección con epidermis y sin epidermis, y puestos en los medios de cultivo con o sin desinfectante según las condiciones de los tratamientos (28-43). También se analizó el tiempo de cultivo de los explantes en los medios B5 con el PPM para determinar el tiempo óptimo de contacto con el desinfectante hasta evitar la contaminación. Lo anterior se verificó cuando los explantes con PPM después de un tiempo determinado (5, 7, 10 y 15 días) fueron cambiados a medios sin PPM y se logró observar explantes axénicos sin ningún tipo de contaminación. Finalmente se seleccionó el tratamiento óptimo para la obtención de explantes axenicos para la inducción a callogénesis.

Tabla 6.1. Tratamientos de desinfección (1-27) usando Agentes Desinfectantes (AD) como NaClO, etanol 70%, Tween 20, cloro, microdyn, Benomilo (BEN) y gentamicina (GEN)

No. Tx	Lavado 1		Lavado 2		Lavado 3	
	[AD]	Tiempo lavado	[AD]	Tiempo lavado	[AD]	Tiempo lavado
1	Etanol 70%	30 s	[NaClO]=0.5% m/v + 2 gotas de tween 20	10 min	3 enjuagues H ₂ O _d estéril	5 min
2	Etanol 70%	1 min	cloro 5% v/v 10% v/v 15% v/v	5 min 5 min 2 min	3 enjuagues H ₂ O _d estéril	5 min
3	Etanol 70%	1 min	cloro 5% v/v 10% v/v 15% v/v	15 min 10 min 5 min	3 enjuagues H ₂ O _d estéril	5 min
4	Etanol 70%	1 min	Cloro 20% v/v + tween 20 0.1%	10 min	3 enjuagues H ₂ O _d estéril	5 min
5	Etanol 70%	1 min	Cloro 40% v/v + tween 20 0.1%	10 min	3 enjuagues H ₂ O _d estéril	5 min
6	Etanol 70%	30s	Cloro 5% v/v + tween 20 0.1%	5 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	3 min

7	Etanol 70%	30s	Cloro 5% v/v + tween 20 0.1%	10 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	3 min
8	Etanol 70%	30s	Cloro 10% v/v + tween 20 0.1%	5 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	3 min
9	Etanol 70%	30s	Cloro 10% v/v + tween 20 0.1%	10 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	3 min
10	Etanol 70%	30s	Cloro 20% v/v + tween 20 0.1%	2 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	3 min
11	Microdyn 1 gota/125mL	5 min	3 enjuagues H ₂ Od estéril	5 min		
12	Microdyn 1 gota/125mL	10 min	3 enjuagues H ₂ Od estéril	5 min		
13	Microdyn 1 gota/125mL	5 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	5 min		
14	Microdyn 1 gota/125mL	10 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	5 min		
15	Etanol 70%	1 min	Microdyn 1 gota/125mL	10 min	3 enjuagues GEN 100µg/mL BEN 200µg/mL	5 min
16	Etanol 70%	3 min	PPM 0.01% v/v	5 min	1 enjuague H ₂ Od estéril	5 min
17	Etanol 70%	3 min	PPM 0.01% v/v	10 min	1 enjuague H ₂ Od estéril	5 min
18	Etanol 70%	3 min	PPM 0.1% v/v	5 min	1 enjuague H ₂ Od estéril	5 min
19	Etanol 70%	3 min	PPM 0.1% v/v	10 min	1 enjuague H ₂ Od estéril	5 min
20	Etanol 70%	3 min	PPM 0.5% v/v	5 min	1 enjuague H ₂ Od estéril	5 min

21	Etanol 70%	3 min	PPM 0.5% v/v	10 min	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min
22	Etanol 70%	3 min	PPM 0.5% v/v	15 min	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min
23	Etanol 70%	3 min	PPM 0.01% v/v	24 h	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min
24	Etanol 70%	3 min	PPM 0.1% v/v	24 h	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min
25	Etanol 70%	3 min	PPM 0.5% v/v	24 h	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min
26	Etanol 70%	3 min	PPM 1% v/v	24 h	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min
27	Etanol 70%	3 min	PPM 1.5% v/v	24 h	1 enjuague H ₂ O _d estéril	5 min

Tabla 6.2. Tratamientos de desinfección (28-43) usando Agentes Desinfectantes (AD) como etanol 70%, Tween 20 y PPM a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

No. Tx	Lavado 1		Lavado 2		Lavado 3		Medio de cultivo con [AD]
	[AD]	Tiempo lavado	[AD]	Tiempo lavado	[AD]	Tiempo lavado	
28	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 1%	1 h	B5 sin PPM
29	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 2%	1 h	B5 sin PPM
30	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 5%	1 h	B5 sin PPM
31	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 10%	1 h	B5 sin PPM
32	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 1%	1 h	B5 + PPM 0.5%
33	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 1%	1 h	B5 + PPM 1%
34	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 1%	1 h	B5 + PPM 2%
35	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 2%	1 h	B5 + PPM 0.5%

36	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 2%	1 h	B5 + PPM 1%
37	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 2%	1 h	B5 + PPM 2%
38	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 5%	1 h	B5 + PPM 0.5%
39	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 5%	1 h	B5 + PPM 1%
40	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 5%	1 h	B5 + PPM 2%
41	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 10%	1 h	B5 + PPM 0.5%
42	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 10%	1 h	B5 + PPM 1%
43	3 lavados con Tween 20 0.1%	3 min	Etanol 70%	3 min	PPM 10%	1 h	B5 + PPM 2%

6.7.4. Determinación de la Viabilidad celular de los Explantes Axénicos

Los explantes que presentaron nula contaminación durante la evaluación de los tratamientos de desinfección (tratamientos 32-43) y que continuaron estériles en el cambio a medios de cultivo sin adición del PPM, fueron evaluados para determinar la viabilidad celular y seleccionados para la inducción a callogenesis. La viabilidad celular fue comprobada mediante un método de fluorescencia (diacetato de fluoresceína, DAF), método que muestra la integridad de la membrana celular y su actividad enzimática a través de la fluorescencia observado en el microscopio electrónico invertido Nikon® Eclipse E400. El método constó de 2 stocks. Se prepararon 5 mL del stock 1 con DAF a una concentración de 5 mg/mL usando acetona como disolvente. Para la preparación del stock 2, se tomaron 100 µL del stock 1 en 5 mL de agua destilada estéril. Posteriormente los explantes (aproximadamente de 0.5 x 0.5 cm de longitud x 0.2 cm de grosor) fueron puestos en contacto con el stock 2 (~100 µL) y se dejó reposar durante aproximadamente 2 minutos. Por último, se colocó cada explante en un portaobjetos y se observó al microscopio con el objetivo 10x. Los explantes que reflejaron la luz ultravioleta con un verde brillante intenso fueron considerados viables y seleccionados para la inducción de callos.

6.8 Inducción a Callogénesis

6.8.1 Preparación de los Medios de Cultivo

Los explantes axénicos de *P. taxifolius* fueron cultivados primeramente en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 30 g/L sacarosa, 3.4 g fitagel, 3 g PVP y ajustándose el pH a 5.8. Posteriormente se usó el medio de cultivo B5 simple (Gamborg *et al.*, 1968) 30 g/L sacarosa, 3.4 g fitagel, 3 g PVP y pH de 5.8. Para la inducción a callogénesis se analizó la efectividad de diferentes fitorreguladores (ANA 0.5 mg/L, Zeatina 0.5 mg/L, 2,4-D 10 mg/L, GA₃ 0.25 mg/L y AIA 0.5 mg/L). Se seleccionaron 3 fitorreguladores (ANA, Zeatina y 2,4-D), para llevar a cabo el diseño experimental PB, debido a que presentaron mejor respuesta a las condiciones de inducción a la desdiferenciación celular. En esta parte experimental, el medio de cultivo B5 fue modificado con la siguiente composición: sacarosa 20 g/L, fitagel 4 g/L, polivinilpirrolidona (PVP) 1 g/L, nitrato de potasio (KNO₃) 5 g/L. Todos los medios de cultivo fueron enriquecidos con agua de coco estéril 20 mL/L y fue ajustado el medio a diferentes pH (5.0, 5.5 y 5.8). Los medios fueron esterilizados por separado a 121 °C durante 15 minutos y vaciados bajo condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

6.8.2. Combinaciones Hormonales y diseño del experimento PB

De acuerdo con las combinaciones arrojadas por el Diseño Plackett Burman (PB), se prepararon 12 diferentes medios de cultivo B5 modificado, con las combinaciones hormonales descritas en la tabla 6.3 donde el signo positivo (+) indica la presencia de la variable y el signo negativo (-) la ausencia de la misma. Los fitorreguladores previamente seleccionados fueron utilizados en las siguientes concentraciones: ANA 0.5 mg/L, zeatina 0.5 mg/L y 2,4-D 10 mg/L.

Tabla 6.3. Diseño experimental PB. Fitorreguladores probados para la inducción a callogénesis: ácido naftaleno acético (ANA) 0.5 mg/L, zeatina 0.5 mg/L y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 10 mg/L; ajuste a diferentes pH como 5.0, 5.5 y 5.8. En oscuridad (+) y luz constante (-).

Tratamiento	pH	Oscuridad	zeatina 0.5 mg/L	2,4-D 10 mg/L	ANA 0.5 mg/L
1	5.0	-	-	+	+
2	5.5	-	-	-	-
3	5.0	+	-	-	+
4	5.5	+	-	+	-
5	5.0	-	+	+	-
6*	5.5	-	+	-	+
7	5.0	+	+	-	-
8	5.5	+	+	+	+
9	5.8	-	-	-	-
10	5.8	+	-	+	-
11	5.8	-	+	-	+
12	5.8	+	+	+	+

*El tratamiento 6 propició exitosamente el evento de callogénesis.

6.8.3. Ajuste del pH y enriquecimiento de los diferentes medios de cultivo

Como se mencionó anteriormente, se prepararon 12 combinaciones de acuerdo al diseño del experimento PB utilizando tres fitorreguladores, los cuales fueron añadidos antes del ajustar el pH de los medios y antes de su esterilización por autoclave, con la finalidad de evitar cambios en el pH y asegurar el pH final seleccionado (5.0, 5.5 y 5.8). En todos los casos, los medios de cultivo fueron enriquecidos con agua de coco (con acción antioxidante natural), que fue esterilizada por un sistema de filtración por membrana (0.2 μm). Esto se llevó a cabo con la ayuda de un soporte de filtro con receptor (Nalgene®), bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Una vez esterilizada (filtrada) el agua de coco, fue adicionada a los medios de cultivo. Esto se realizó posterior a la esterilización de los medios en autoclave, encontrándose los medios aún en estado líquido, con una temperatura tolerable al tacto (± 30 °C) antes de la gelificación. Esto se implementó con la finalidad de evitar la degradación de los nutrientes proporcionados por el agua de coco.

6.8.4. Preparación / Selección de explantes

Se partió del material vegetal axénico de *P. taxifolius*, del cual se realizaron cortes de los tallos (raquis) de las frondes con aproximadamente 1 cm x 0.5 cm de longitud, en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Estos explantes fueron puestos en los medios de cultivo B5 modificado en diferentes condiciones como lo muestra la tabla 6.3.

6.8.5. Condiciones de cultivo en la inducción de callos

Los explantes axénicos fueron cultivados a una temperatura de 25 °C bajo Los explantes axénicos fueron cultivados a una temperatura de 25 °C bajo condiciones de luz y oscuridad constante como se muestra en la tabla 6.3. Los explantes fueron observados cada tercer día durante un mes hasta la aparición de los callos.

6.8.6. Determinación de la viabilidad celular de las Células desdiferenciadas

La viabilidad de los callos fue determinada por un método de fluorescencia (diacetato de fluoresceína, DAF). Método que muestra la integridad de la membrana celular a través de su actividad enzimática que degrada el diacetato de fluorescencia, cuya fluorescencia se observa en el microscopio electrónico invertido. El método constó de 2 stocks. Se prepararon 5 mL del stock 1 con DAF a una concentración de 5 mg/mL usando acetona como disolvente. Para la preparación del stock 2, se tomaron 100 μL del stock 1 en 5 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se mezcla la muestra (células desdiferenciadas) con el stock 2 en una

proporción 1:1 (m/v) y se deja reposar durante aproximadamente 2 minutos. Se coloca una gota (~50 μ L) en un portaobjetos y se observa en el microscopio electrónico invertido (Nikon® Eclipse E400) con el objetivo 10 x.

6.7.11. Extracción de alcaloides en Células desdiferenciadas

Se realizó la extracción de alcaloides totales en las células desdiferenciadas mediante el protocolo de Extracción de Wu & Gu (2006), en seguida se muestra el esquema del procedimiento de la extracción acido-base de alcaloides totales. En estudios posteriores, Soto en el 2016 identificó huperzina A en los extractos alcaloideos de muestras de células desdiferenciadas (M15 y M57).

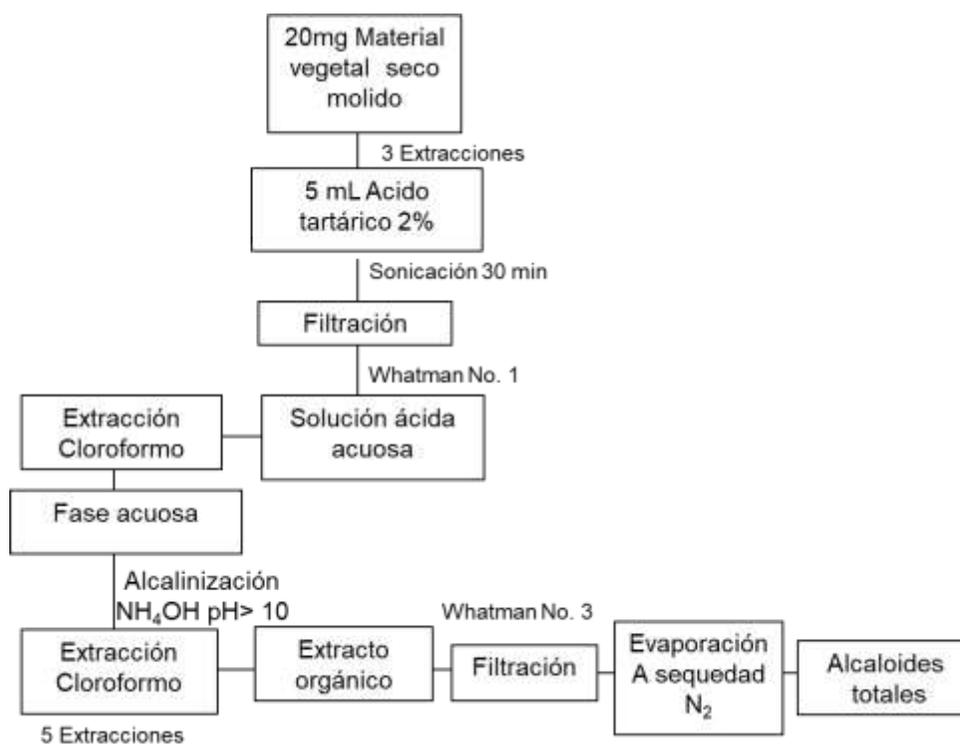


Figura 6.6. Esquema de la extracción de alcaloides de las células desdiferenciadas de *P. taxifolius*.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis fitoquímico

El material vegetal seco (121 g) se desgrasó con hexano y luego se realizaron cinco extracciones mediante maceración en metanol, sonicación y filtración. Los cinco extractos metanólicos se concentraron usando un evaporador rotatorio y se obtuvo en total 11.1 g de extracto metanólico

7.1.1. Identificación y extracción de alcaloides totales de *P. taxifolius*

Se realizó la extracción de los alcaloides totales (EAT) mediante un método de extracción ácido-base (sección 6.3), donde se obtuvo un rendimiento de 1.36 g. En la siguiente figura se muestra la placa cromatográfica de la fase orgánica originada a partir del extracto metanólico. Según el revelado con Dragendorff se nota la presencia de alcaloides en el extracto metanólico y en la fase orgánica básica (FO2) (figura. 7.1)

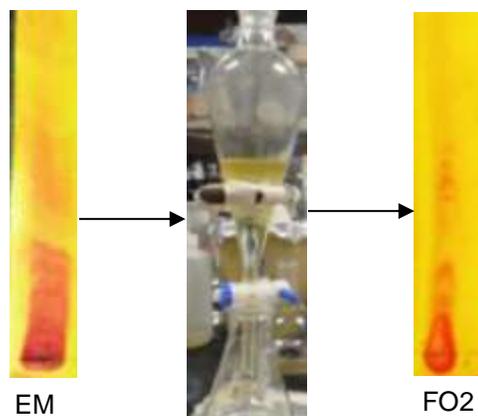


Figura 7.1. CCF Fase orgánica de frondas de *P. taxifolius*: FM: CHCl₃:MeOH 9:1; FE: sílica gel
Revelador: Dragendorff. EM: extracto metanólico; FO2: fase orgánica 2 básica

7.1.2. Aislamiento y purificación de los alcaloides y de los compuestos de interés

Los alcaloides totales (1.36 g) se sometieron a una separación cromatográfica mediante columna abierta 1 (CCA1) de la cual se obtuvieron 14 fracciones que se juntaron según su perfil químico (figura 7.2).

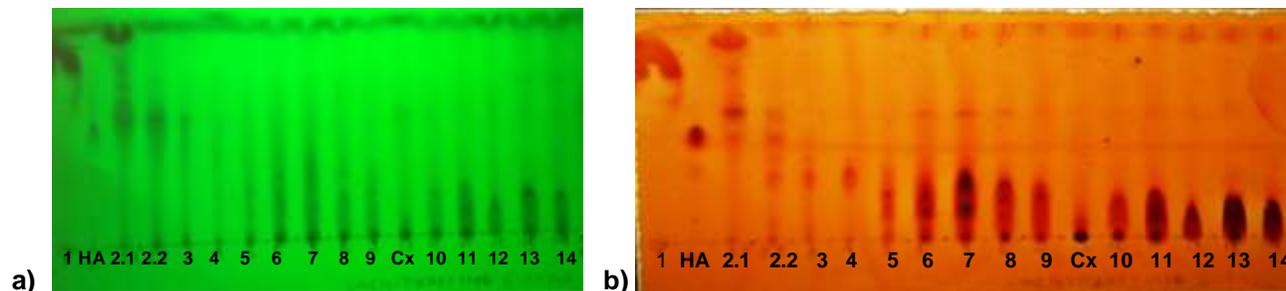


Figura 7.2. CCF de la CCA1: Fracciones 1-14 de frondas de *P. taxifolius*: FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1; FE: sílica gel; a) placa observada en UV; b)Revelador: Wagner. CX: control (extracto total de alcaloides), HA: huperzina A.

En la siguiente tabla se muestran las cantidades en miligramos de las catorce fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta a partir de 1.36 g de alcaloides totales.

Tabla 7.1. Fracciones (1-14) obtenidas la cromatografía en columna abierta 1 (CCA1) a partir del extracto de alcaloides totales (1.36 g).

Fracción	(mg)
1	87.9
2.1	527
2.2	30.1
3	14.8
4	29.5
5	18.5
6	12.4
7	23.6
8	9.8
9	9.3
10	17.7
11	39.7
12	36.2
13	28.7
14	14.1

Se purificaron tres compuestos (T1, T2 y T3) mediante una serie de separaciones cromatográficas.

7.1.2.1. Purificación del compuesto T1:

Se realizaron 4 separaciones cromatograficas (CCA2, CCA3, CCA4 y CCA5) mediante columna abierta, a partir de la fracción 3 (14.8 mg) y la fracción 4 (29.5 mg) provenientes de la CCA1. El siguiente esquema muestra el seguimiento fitoquímico para la purificación de T1, indicando las subfracciones generadas en cada columna y los rendimientos obtenidos.

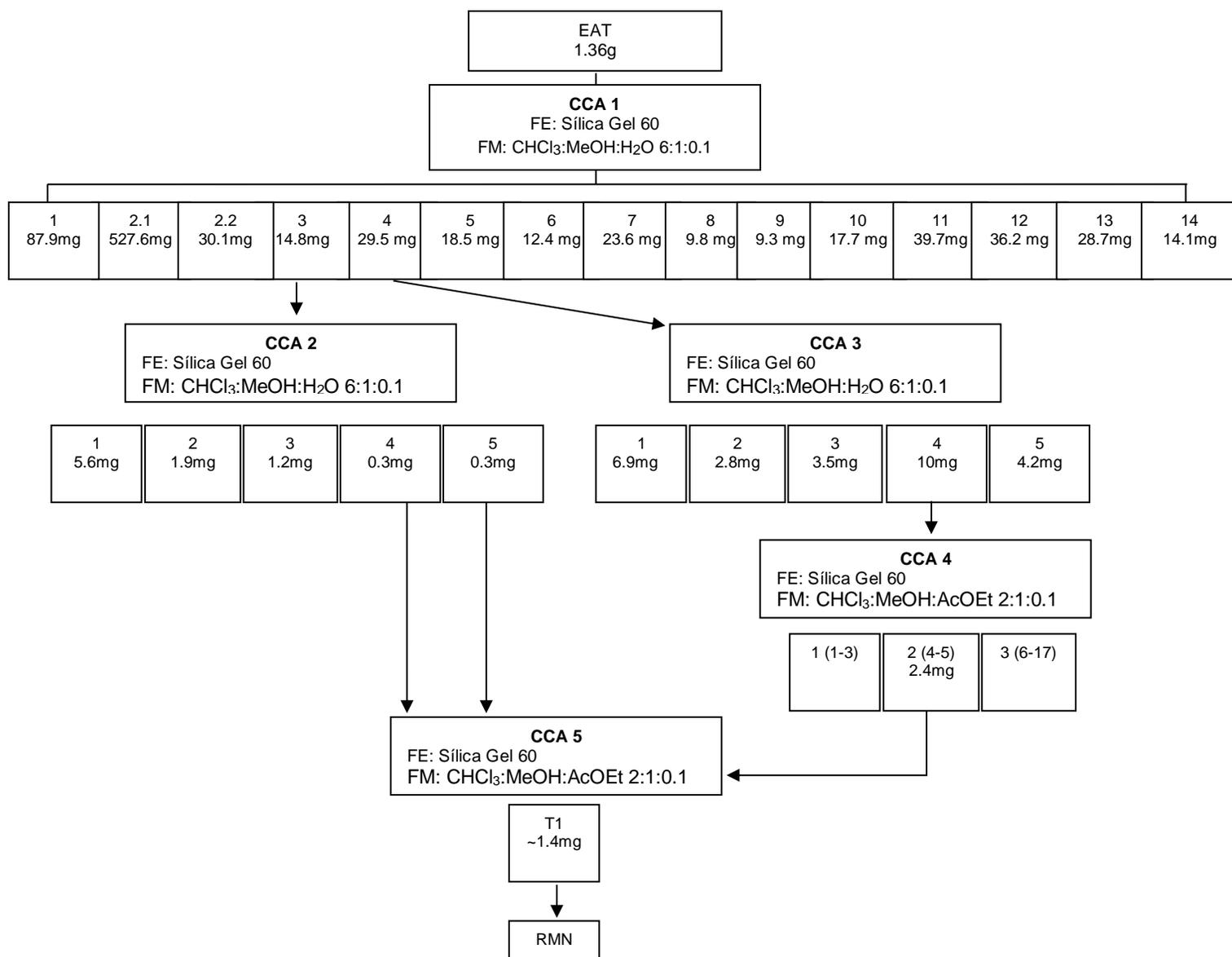


Figura 7.3. Esquema general de los rendimientos de las CCA1-CCA5 de *P. taxifolius* para la purificación del compuesto T1; FE: sílica gel 60 en CCA1-CCA5. FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1-CCA3, FM: CHCl₃:MeOH:AcOEt 2:1:0.1 en CCA4- CCA5.

En la CCA2, se usó como muestra la fracción 3 (14.8 mg) de la CCA1 (figura 7.5 **a**)), la cual fue sometida a una separación cromatográfica por columna abierta (figura 7.5 **b**)) donde se obtuvieron 5 subfracciones. Las subfracciones 4 (0.3 mg) y 5 (0.3 mg) se juntaron por presentar el mismo factor de retención y observarse casi puras.

En la CCA 3, la fracción 4 (29.5 mg) de la CCA1 se sometió a la separación cromatográfica (figura 7.5 **c**)) obteniéndose 5 subfracciones, de las cuales la fracción 4 (10mg) se sometió a la siguiente columna (CCA4).

En la CCA4 (figura 7.5 **d**)) se usó la fracción 4 (10 mg) de la CCA3 antes mencionada, por poseer un compuesto mayoritario con el mismo factor de retención que las subfracciones 4 y 5 de la CCA2 (figura 7.4). En la CCA4 se obtuvieron 3 subfracciones de las cuales la fracción 2 (vial 4 y 5= 2.4mg) se usó para posteriormente continuar con la separación cromatográfica (CCA5) (figura 7.5 **e**))

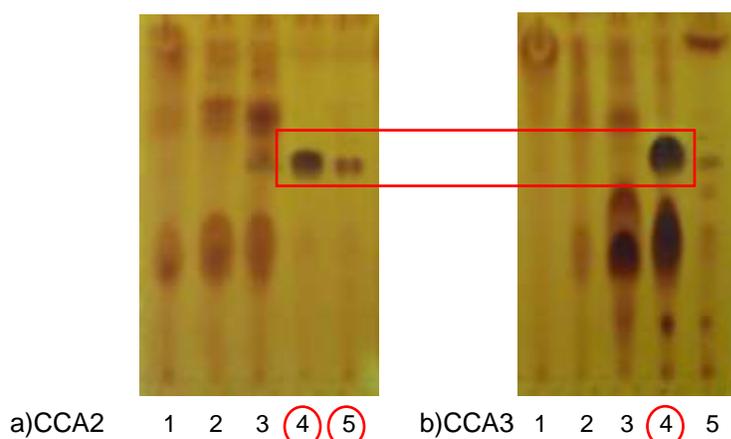


Figura 7.4. CCF de a) CCA2 y b) CCA3: Comparación entre las Fracciones 3 y 4 de la a) CCA2 y la fracción 4 de la b) CCA3 con factor de retención similar. CCA2 y CCA3: FM: CHCl₃: MeOH: H₂O: 6:1:0.1; FE: sílica gel; Cx: control; Revelador: Wagner.

En la CCA5 (figura 7.5 **e**)) se usó como muestra la mezcla de 2.4 mg de la fracción 2 (CCA4) con las fracciones 3 y 4 (total 0.6 mg) de la CCA2 debido a que presentan características químicas similares (figura 7.4) con el mismo factor de retención.

Finalmente se obtuvo un compuesto puro denominado **T1**, el cual se analizó mediante RMN protónica y de carbono 13.

La siguiente figura muestra en resumen la serie de separaciones cromatográficas para la obtención de un compuesto puro:

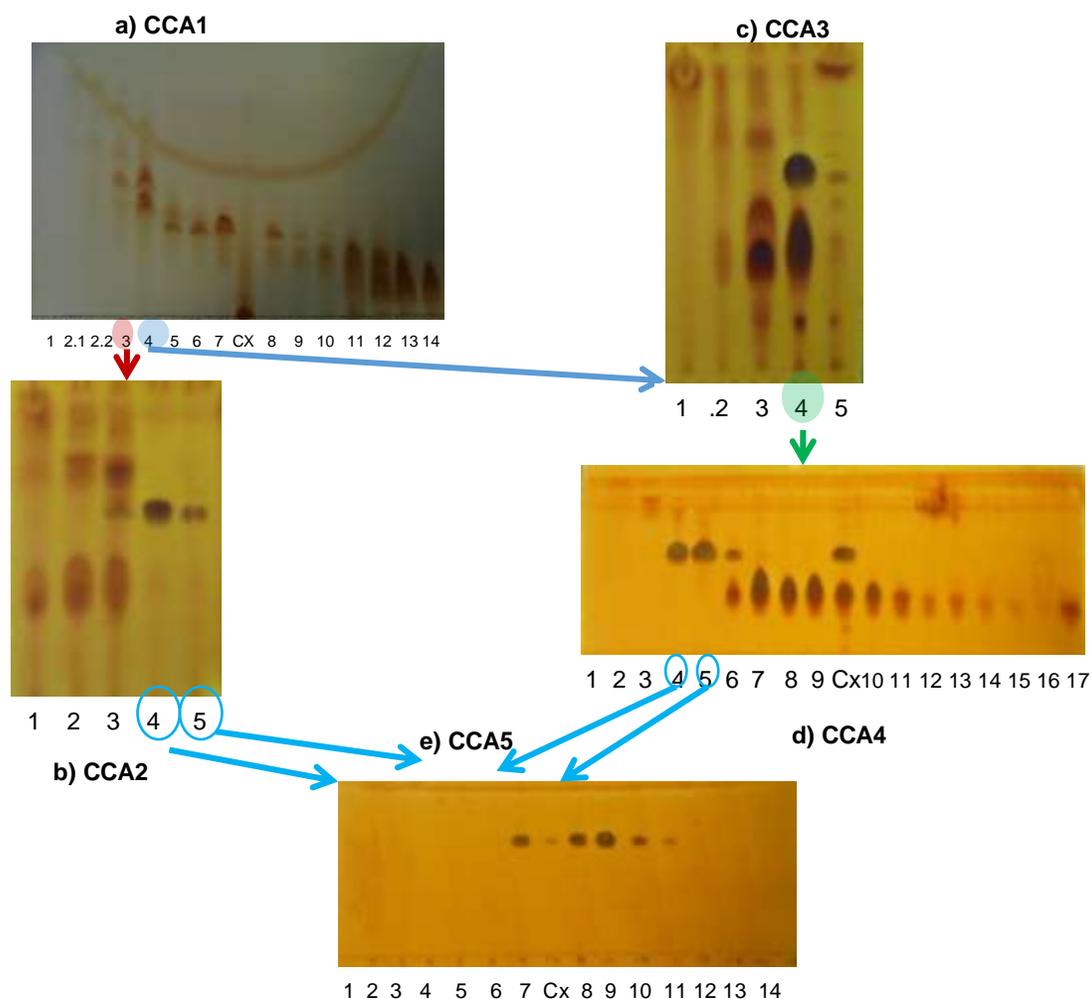
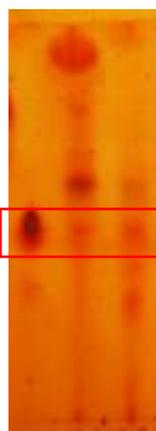


Figura 7.5. Esquema general de las CCF1-CCF5 de los fraccionamientos de las CCA1-CCA5. Muestra inicial en la CCA1 el extracto de alcaloides totales de *P. taxifolius*; FE: a-f) sílica gel 60 en CCF1-CCF5. FM: a-c) CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1-CCA3, FM: e-f) CHCl₃:MeOH:AcOEt 2:1:0.1 en CCF4-CCF5. Revelador: Wagner.

Por otro lado, las fracciones 2.1 y 2.2 (CCA1) se siguieron con el análisis fitoquímico debido a que presenta un factor de retención similar al de la huperzina A.



HA 2.1 2.2

Figura 7.6. CCF de las fracciones 2.1, 2.2 de frondas de *P. taxifolius*: FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1; FE: sílica gel; Revelador: Wagner, CX: control (extracto total de alcaloides), HA: hupA.

7.1.2.2. Purificación del compuesto T2:

Se realizaron una serie de 3 separaciones cromatograficas por columna abierta (CCA6, CCA7 y CCA8) a partir de la fracción 2.1 de la CCA1. A continuación se esquematiza el seguimiento fitoquímico para la purificación del Compuesto T2.

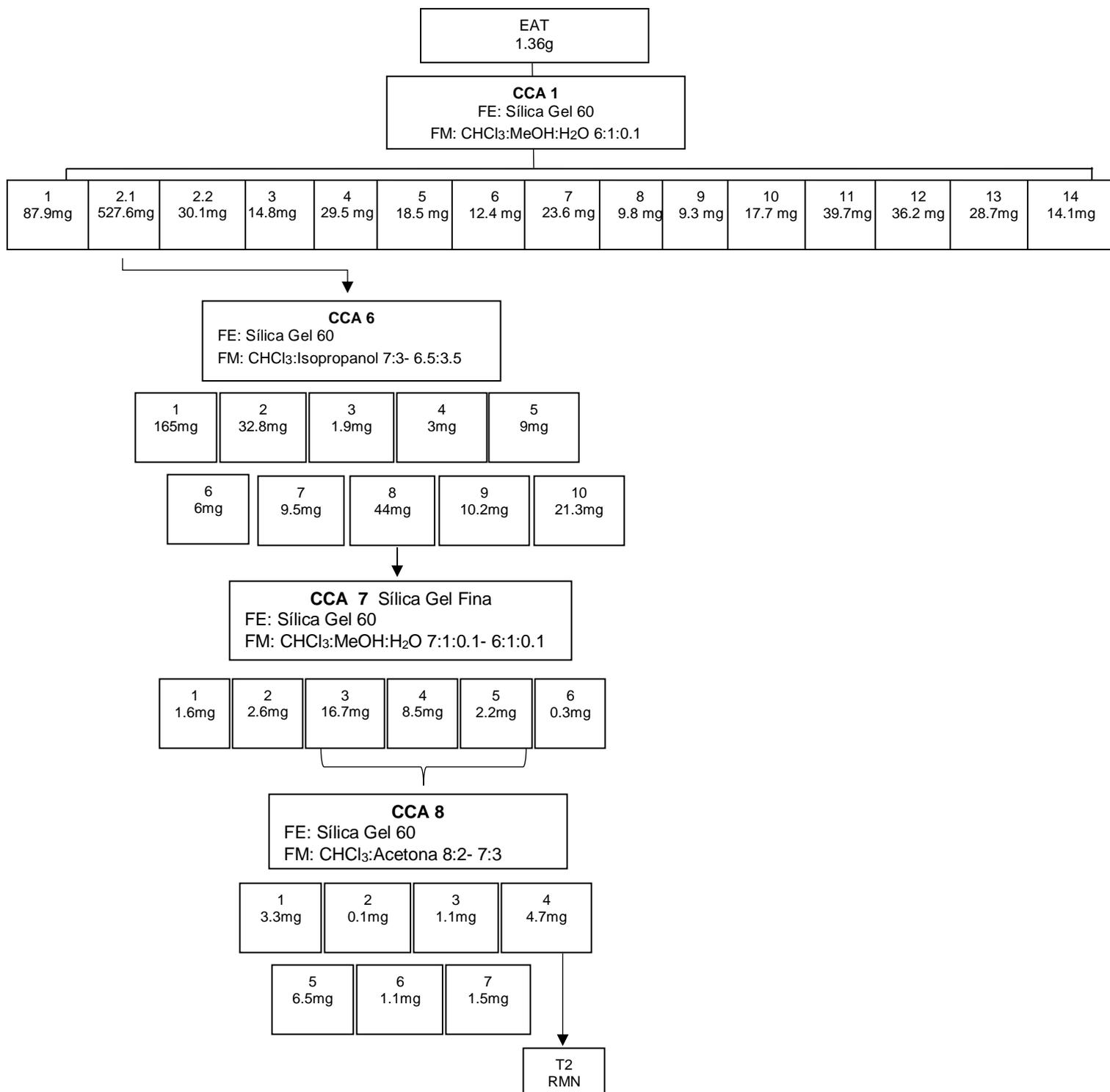


Figura 7.7. Esquema general de los rendimientos de las CCA1, CCA6, CCA7 y CCA8 obtenidos inicialmente a partir de la fracción 2.1 de la CCA1 (EAT de *P. taxifolius*); FE: sílica gel 60 en CCA1, CCA6, CCA7 y CCA8. FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1, FM: CHCl₃:Isopropanol 7:3- 6.5:3.5 en CCA6; FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 7:1:0.1- 6:1:0.1 en CCA7; FM: CHCl₃:Acetona 8:2- 7:3 en CCA8.

Para la purificación del compuesto T2 se realizó la CCA6 (figuras 7.7 y 7.8) a partir de 500mg de la fracción 2.1 (CCA1) obteniéndose 10 subfracciones (figura 7.8). Las subfracciones 8, 9 y 10 poseían un factor de retención parecido al de la HupA (figura 7.8). De esas tres subfracciones, la fracción 8 obtuvo mayor rendimiento (44mg), por lo que se sometió a la siguiente separación mediante la CCA7.

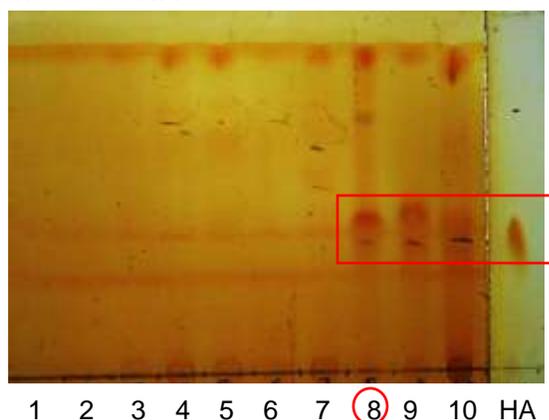


Figura 7.8. CCF de la CCA6 de *P. taxifolius*: Muestra: fracción 2.1 (CCA1) FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 7:1:0.1; FE: sílica gel; Revelador: Wagner, HA: hupA.

En la CCA7 (figuras 7.7 y 7.9) se obtuvieron 6 subfracciones (figura 7.9). Las subfracciones 3, 4 y 5 se observaron con un compuesto similar, adicionalmente como se muestra en la figura 7.7 dos de esas fracciones obtuvieron los mayores rendimientos (subfracción 4 y 5 con un rendimiento de 4.7mg y 6.5mg). Por tal razón se juntaron por la similitud química y se realizó una separación en columna CCA8.

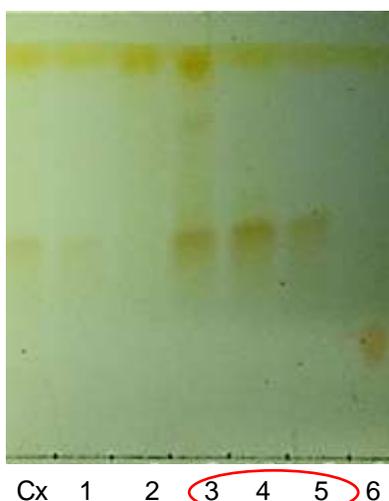


Figura 7.9. CCF de la CCA7 de *P. taxifolius*: Muestra: fracción 8 (CCA6) FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1; FE: sílica gel; Revelador: Wagner. Cx: control.

En la CCA 8 se obtuvieron 7 subfracciones (Figura 7.10). Finalmente se obtuvo un compuesto puro (subfracción 4) denominado **T2**, el cual se analizó mediante RMN protónica y de carbono 13.



Figura 7.10. CCF de la CCA8 de *P. taxifolius*: Muestra: fracciones 3-5 (CCA7) FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1; FE: sílica gel; Revelador: Wagner. Cx: control.

7.1.2.3. Purificación del compuesto T3:

Se realizaron 2 separaciones cromatograficas por columna abierta (CCA6 y CCA9) a partir de la fracción 2.1 de la CCA1. A continuación se esquematiza el seguimiento fitoquímico para la purificación del Compuesto T3.

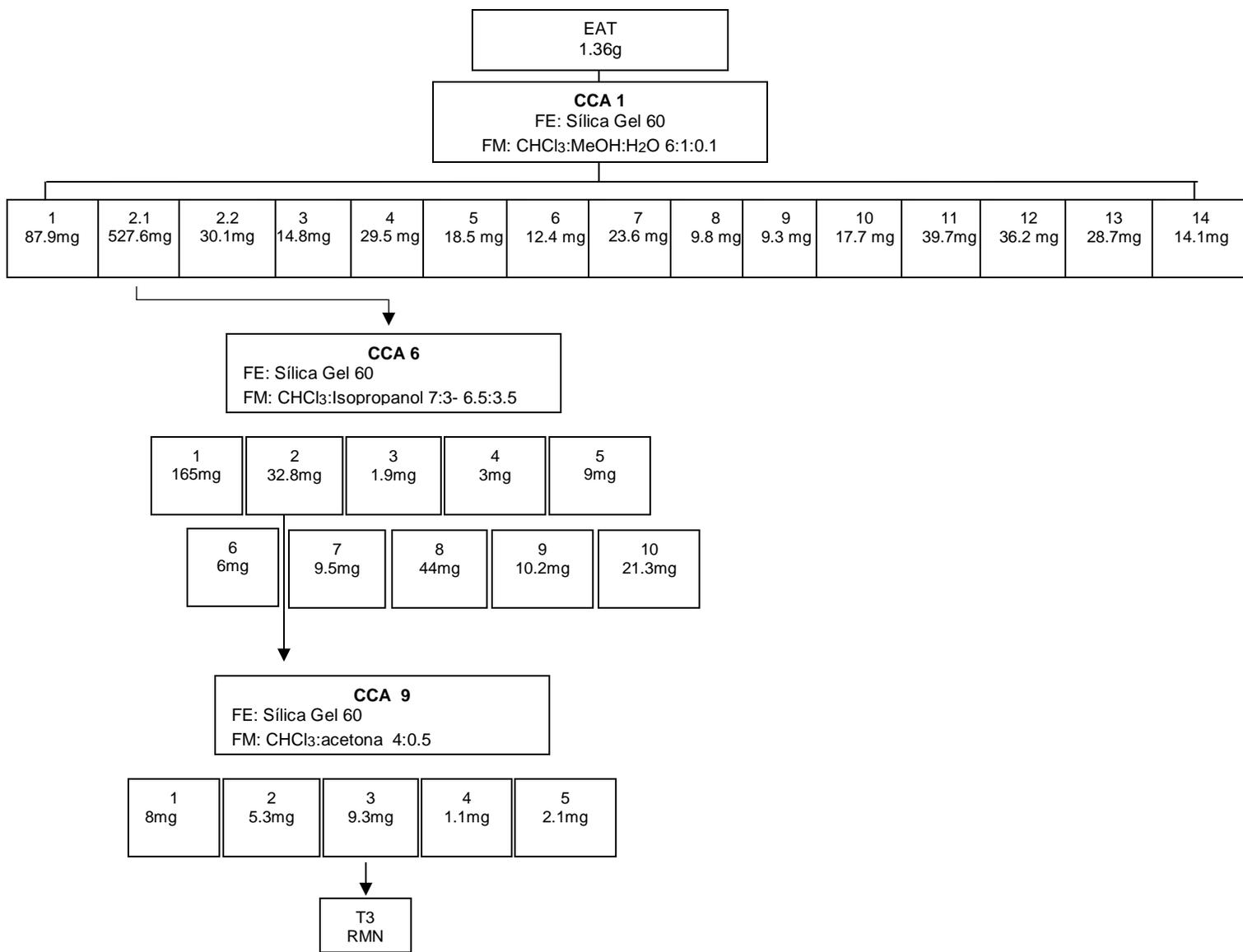


Figura 7.11. Esquema general de los rendimientos de las CCA1, CCA6, CCA9 a partir de la fracción 2.1 de la CCA1 (EAT de *P. taxifolius*); FE: sílica gel 60 en CCA1, CCA6 y CCA9. FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1, FM: CHCl₃:Isopropanol 7:3- 6.5:3.5 en CCA6; FM: CHCl₃:acetona 4:0.5 en CCA9.

En la CCA 6 se tomaron 500mg de la fracción 2.1 de la CCA1 (figuras 7.11 y 7.12) y se realizó una separación cromatográfica por columna obteniéndose 10 subfracciones (figura 7.12). La subfracción 2 mostró un compuesto intenso con un rendimiento de 32.8mg por lo que se sometió a una posterior separación cromatográfica CCA9 (figura 7.11).

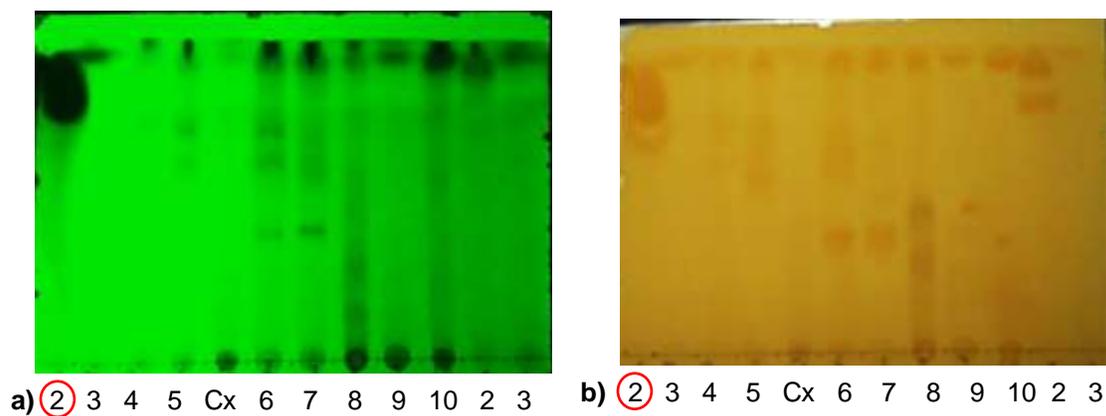


Figura 7.12. CCF de la CCA6 de *P. taxifolius*: Muestra: fracción 2.1 (CCA1) FM: CHCl₃: Acetona 4:1; FE: sílica gel; Cx: control; Revelador: a) Luz UV; b) Wagner.

En la CCA9 se obtuvieron 5 subfracciones (Figura 7.13) de las cuales, la fracción 3 (9.3mg) denominado Compuesto **T3** se observó pura en la placa cromatografica por lo que se sometió a RMN protónica y de carbono 13 (figura 7.14).



Figura 7.13. CCF de la CCA 9 de *P. taxifolius*: Muestra: fracción 2 (CCA6) FM: CHCl₃: Acetona 5:0.5; FE: sílica gel; Cx: control; Revelador: Wagner.

7.1.2.4. CCA 10 y CCA11

Se realizaron las CCA10 y la CCA11 para la separación de los alcaloides de interés de las fracciones 11 y 12 (CCA1), las cuales en el ensayo de la inhibición de la AChE se mostraron activas con un 75.17% y 73.81% de la inhibición enzimática (sección 7.2). Es importante mencionar que en estas separaciones por columna (CCA10 y CCA11) no se llegó a la obtención de compuestos puros y para la continuación de subsecuentes cromatografías por columna abierta, los rendimientos fueron muy bajos (figura 7.15).

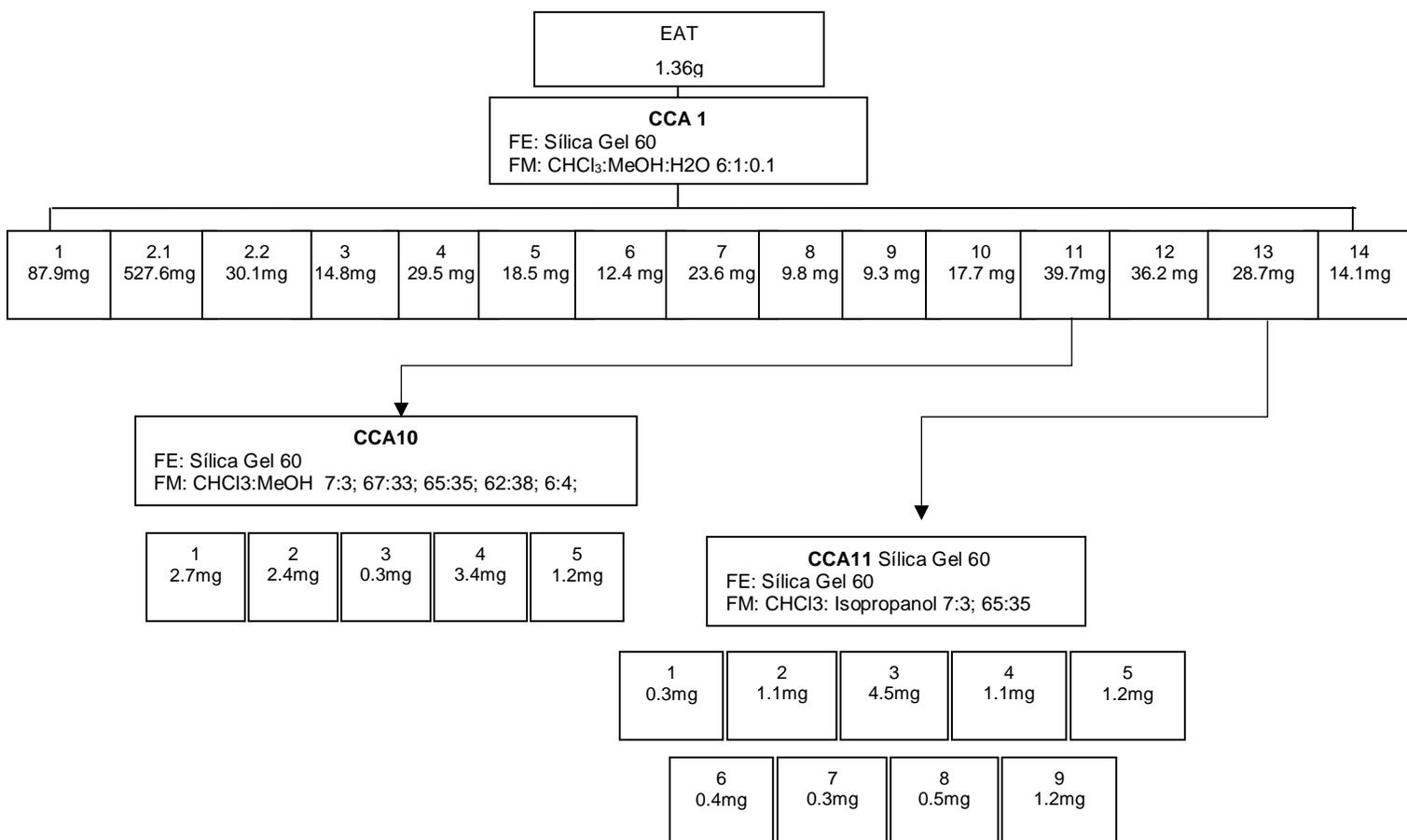


Figura 7.14. Esquema general de los rendimientos de las CCA1, CCA10 y CCA11, a partir de la fracción 2.1 de la CCA1 (EAT de *P. taxifolius*); FE: sílica gel 60 en CCA1, CCA10 y CCA11. FM: CHCl₃:MeOH:H₂O 6:1:0.1 en CCA1, FM: CHCl₃:MeOH 7:3; 67:33; 65:35; 62:38; 6:4 en CCA8; FM: CHCl₃: Isopropanol 7:3; 65:35 en CCA11.

7.3 Evaluación de la Actividad Anticolinesterásica

En seguida se muestran los porcentajes de inhibición de la enzima AChE (mediante el método colorimétrico de Ellman *et al.*, 1961) de las fracciones 11-14 de la CCA1 a diferentes concentraciones (50, 10 y 1 µg/mL). Los resultados se expresan como la media ± SD.

Tabla 7.2 Porcentajes de inhibición de la AChE, muestras: fracciones 11-14 (CCA1); concentraciones: 50, 10 y 1 µg/mL.

	Inhibición de la enzima AChE (%)		
	50 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
Fracción 11	75,17 ± 4,1	42,54 ± 4,8	19,11 ± 0,7
Fracción 12	21,52 ± 4,4	16,72 ± 2,9	8,10 ± 1,2
Fracción 13	73,81 ± 2,9	34,18 ± 3,9	10,07 ± 3,2
Fracción 14	71,36 ± 2,9	29,33 ± 3,8	6,03 ± 1,7

Se presenta mejor actividad a la concentración de 50 µg/mL, ya que a esta concentración las fracciones 11, 13 y 14 tienen porcentajes de inhibición enzimática > 70%. La fracción 11 es la que presenta mayor actividad con un 75.17% de inhibición enzimática a la concentración de 50 µg/mL. Con estos resultados se sugiere realizar el análisis químico como separación, purificación y elucidación de las fracciones 11, 13 y 14, además que una vez aprendida la metodología (en la estancia de investigación) del ensayo enzimático se pretende montarlo en el laboratorio y evaluar las fracciones y subfracciones restantes.

7.4 Cultivo *in vitro* de *P. taxifolius*

7.4.1. Tratamientos de desinfección de *P. taxifolius*

Para la desinfección de los explantes, previamente se realizó un prelavado (prelavado 1 o prelavado 2) para la eliminación de los restos de tierra y sustrato presentes en la planta en el momento de su colecta. El prelavado más exitoso resultó ser el prelavado número 2, debido a que se presentó menor contaminación en los tratamientos de desinfección posteriores. El prelavado 2 se estandarizó junto con los tratamientos de desinfección 28-43.

Tratamientos del 1-15: en esta serie de tratamientos se usaron diversos tratamientos para la desinfección como cloro, antifungico (benomilo), antibacteriano (gentamicina) y microdyn a diferentes concentraciones y tiempos de enjuague. En todos los tratamientos se presentó severa contaminación fungica y bacteriana, además de que al lograr el nulo crecimiento patógeno los explantes se oxidaban y morían.

Tratamientos del 16-27: en esta serie de tratamientos se empezó a usar el desinfectante PPM (Plant Preservative Mixture ®) con concentraciones muy bajas (0.01%, 0.1%, 0.5% y 1%), las cuales no fueron efectivas para la desinfección.

7.4.2. Estandarización del Protocolo de Desinfección

Tratamientos del 28-43: Se usó el prelavado 2 en todos los casos, el protocolo se trató de una serie de 3 lavados en donde los lavados 1 y 2 eran los mismo. Para el caso del tercer lavado, este se realizó durante 1 hora en todos los casos y se usó PPM en distintas concentraciones (1%, 2%, 5% y 10%), lo que también vario en cada tratamiento fue la exposición de los explantes desinfectados en medios de cultivo B5 durante 5 y 7 días (figura 7.16 y figura 7.17) con a diferentes concentraciones (0.5%, 1% y 2%) y también se analizaron los medios sin PPM.

La esterilidad de los explantes fue observada durante los tiempos de exposición del PPM en los medios. Posteriormente los explantes se cambiaron a medios sin desinfectante.y se analizó si en el cambio de medio se presentaban algún tipo de contaminación. Los tratamientos 28-31 (tabla 6.2) donde los medios nos fueron adicionados con PPM, presentaron contaminación y nula esterilidad, por tal razón es necesario la adición de PPM en los medios B5.

En la siguiente tabla se resumen los tratamientos de desinfección 32-43 con distintas concentraciones de PPM (1, 2, 5 y 10%), que se analizaron a diferentes tiempos de contacto del desinfectante en el medio.

Tabla 7.3. Tratamientos de desinfección 32-43 de frondas de *P. taxifolius*.

Desinfección	Agente	Concentración	Tiempo	Medio de cultivo
32-34	PPM ®	1%	1h	0.5, 1 y 2% PPM
35-37	PPM ®	2%	1h	0.5, 1 y 2% PPM
38-40	PPM ®	5%	1h	0.5, 1 y 2% PPM
41-43	PPM ®	10%	1h	0.5, 1 y 2% PPM

La siguiente imagen muestra un resumen de los tratamientos de desinfección (del 24-35) a diferentes concentraciones de desinfectante en los lavados y en los medios de cultivo con PPM durante 5 días.

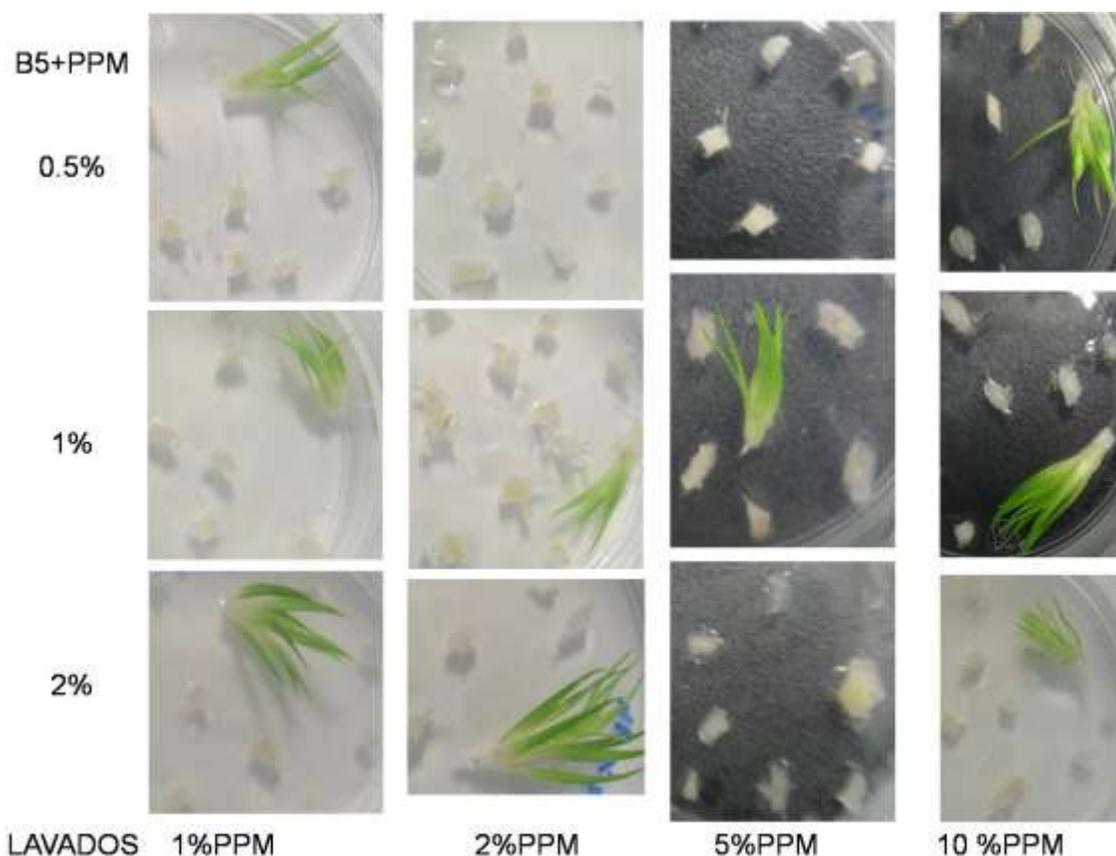


Figura 7.18 Tratamientos de desinfección (PPM 1, 2, 5 y 10% durante 1 h) y en contacto en medio B5 (PPM 0.5, 1 y 2% durante 5 días).

En la siguiente figura se pueden observar los explantes a los que se les hicieron los tratamientos de desinfección (1, 2, 5 y 10% PPM 1h), los cuales se dejaron siete días en contacto con el medio B5+ PPM en diferentes concentraciones (0.5%, 1% y 2%).

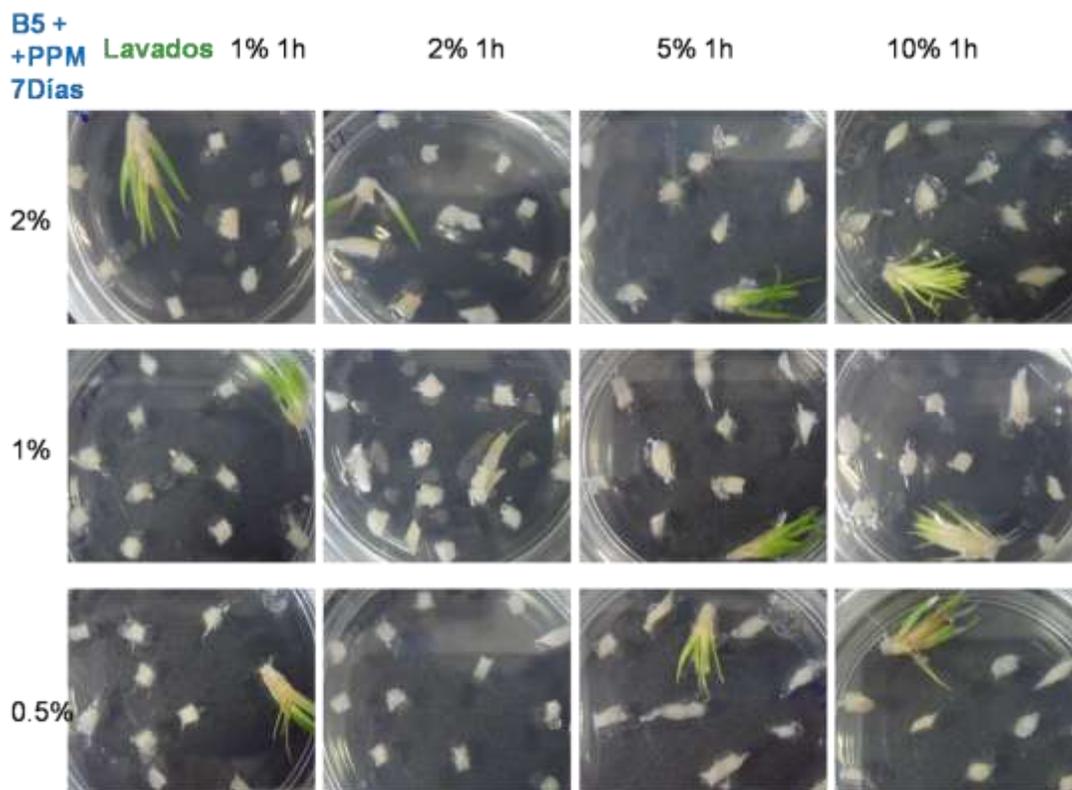


Figura 7.19. Tratamientos de desinfección 32-43 (PPM 1, 2, 5 y 10% durante 1 h) y en contacto en medio B5 (PPM 0.5, 1 y 2% durante 7 días).

7.4.3 Determinación de la Viabilidad celular de los Explantes Axénicos

Los explantes desinfectados que presentaron nula contaminación fueron evaluados para determinar la viabilidad celular y seleccionados para la inducción a callogénesis. La viabilidad celular fue comprobada mediante un método de fluorescencia (diacetato de fluoresceína, FDA). Los explantes fueron observados en el microscopio electrónico invertido. Se seleccionaron los tratamientos con menor concentración de PPM y menor tiempo de exposición en los medios con el desinfectante. La siguiente figura muestra los tratamientos 32-43 expuestos 7 días con PPM donde se puede observar la viabilidad en cada tratamiento.

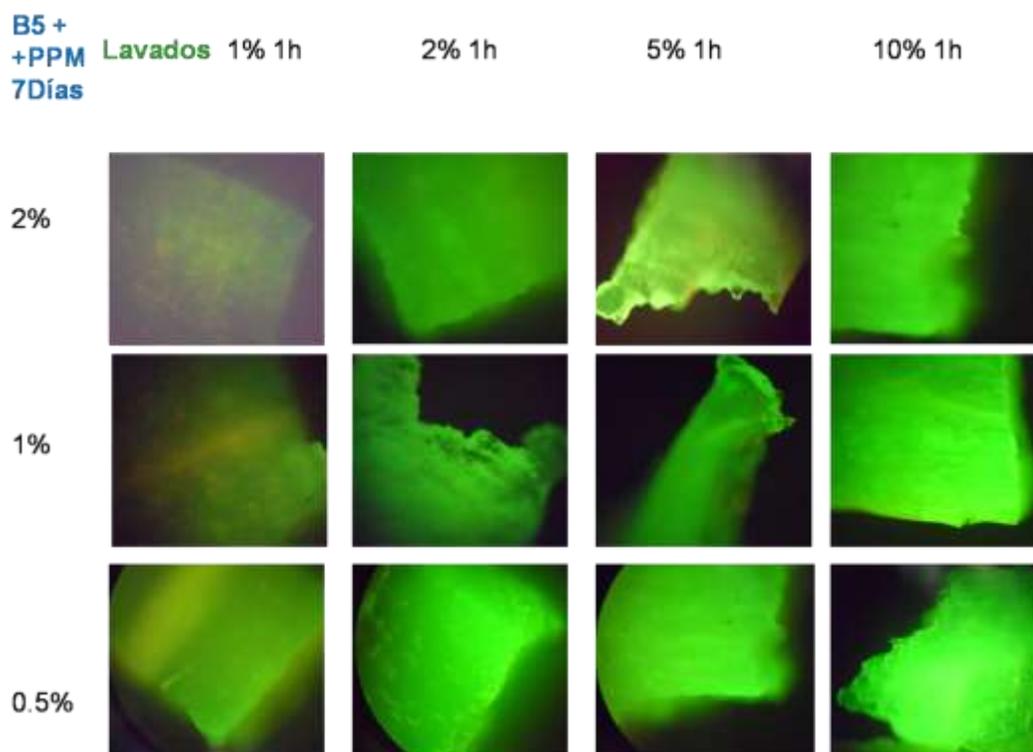


Figura 7.20. Viabilidad: explantes observados en el microscopio de fluorescencia de los tratamientos de desinfección 32-43 (PPM 1, 2, 5 y 10%) durante 1 h y en contacto en medio B5 +PPM 0.5, 1 y 2% durante 7 días).

7.4.4 Obtención de los explantes axénicos: Los mejores tratamientos fueron del 35-37 con una concentración de PPM del 2%, a los 5 días el mejor tratamiento fue el número 37 con un lavado de 1h con PPM al 2% y con PPM a la mayor concentración de exposición en los medios B5. Por otro lado, los tratamientos (35-37) donde el lavado fue de 1 h con el PPM 2% pero con un tiempo mayor de exposición (10 días) en los medios de PPM (0.5%, 1% y 2%), todos los tratamientos fueron exitosos, eligiendo como el más idóneo (tratamiento 35) el que contiene menor concentración en los medios de cultivo.

7.4.5 Inducción a Callogénesis

La callogénesis ocurrió a partir de explantes axénicos de las frondas de *P. taxifolius*. Para tal objetivo, se realizó un modelo llamado Plackett Burman (modelo PB) antes descrito (sección 6.8.2). El tratamiento que resulto ser exitoso para la callogénesis fue la combinación del tratamiento número 6 (Tabla 6.3) que consistió en medio B5 modificado adicionado con ANA (0.5 mg/ml) y zeatina (0.5 mg/mL), a un pH 5.5 y luz constante. Los callos fueron identificados

a los 30 días de iniciar dicho tratamiento con un tamaño de 1 cm de diámetro. Estos callos fueron friables de forma nodular, de color beige, sin agua alrededor y compacto en su totalidad, así como no embriogénicos, como se muestra la figura 7.19. La viabilidad de los callos (figura 7.20) fue determinada por el método de diacetato de fluoresceína antes descrito (sección 6.8.6).

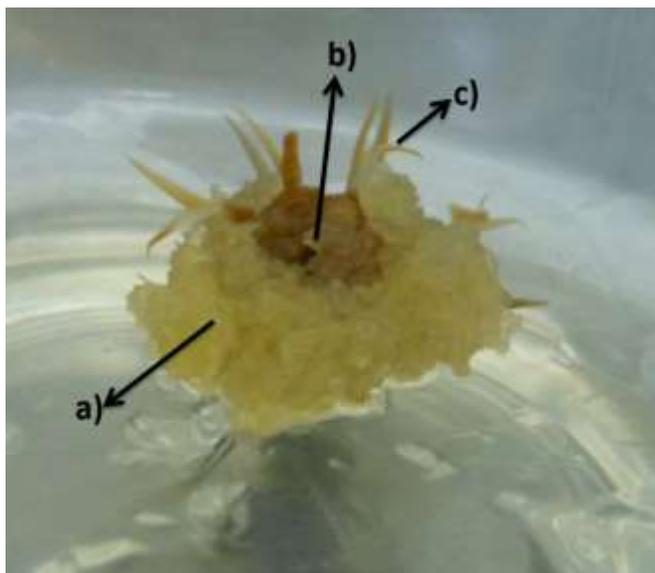


Figura 7.21. Proceso exitoso de calogénesis inducida con el medio de cultivo B5 modificado, adicionado con ácido naftalenacético (0.5 mg/L) y zeatina (0.5 mg/L), a un pH 5.5 y luz constante. Se pueden observar: a) formación de callos de color beige brillante, b) raquis y c) pinas.

7.4.6 Efecto de diferentes Medios de Cultivo

Los 12 tratamientos de cultivo utilizados fueron descritos en la Tabla 6.3, siendo que el tratamiento 6 fue el único que indujo la formación de callos de color beige brillante. Los 11 tratamientos con distintos fitorreguladores que no indujeron la calogénesis mostraron oxidación de los explantes y nulo crecimiento durante el mes de observación.

7.4.7 Efecto de diferentes pH sobre la inducción de callos

Los medios fueron ajustados a tres diferentes pH como 5.0, 5.5 y 5.8. El tratamiento 6 resultó ser más efectivo, encontrando el pH idóneo de 5.5 para la inducción a calogénesis. Por otro lado, los medios fueron enriquecidos con agua de coco, como un antioxidante natural que además aporta factores de crecimiento y nutrientes, lo cual favorece la obtención de células desdiferenciadas. Posterior a la calogénesis, los medios de cultivo de mantenimiento y producción fueron en las mismas condiciones para la generación de callos, solamente cambiando a un pH de 5.8.

7.4.8 Efecto de las condiciones de cultivo en la inducción de callos

Las condiciones de cultivo más importantes que favorecen la inducción de callos son la temperatura y la luminosidad. Se estandarizó a 25 °C y se probaron dos condiciones luz constante y oscuridad constante. El tratamiento 6, el único que indujo a callogénesis fue a luz constante, siendo que los demás tratamientos presentaron oxidación de los explantes y nulo crecimiento.

7.4.9 Determinación de la viabilidad celular de los callos

La viabilidad de las células desdiferenciadas fue determinada por un método de fluorescencia, con el diacetato de fluoresceína (DAF) y observado al microscopio electrónico invertido. Las células que reflejaron la luz ultravioleta con un verde brillante intenso fueron consideradas viables. El DAF es un sustrato de esterasa que penetra en las células y es hidrolizado por la actividad enzimática intracelular y de membrana. Tras la hidrólisis por esterasas intracelulares produce fluorescencia, que sirve como una sonda de viabilidad de integridad de membrana celular y actividad enzimática. Mediante esta técnica se lograron observar los callos viables, compactos en su totalidad, friables y con coloración verde brillante (figura 7.19).

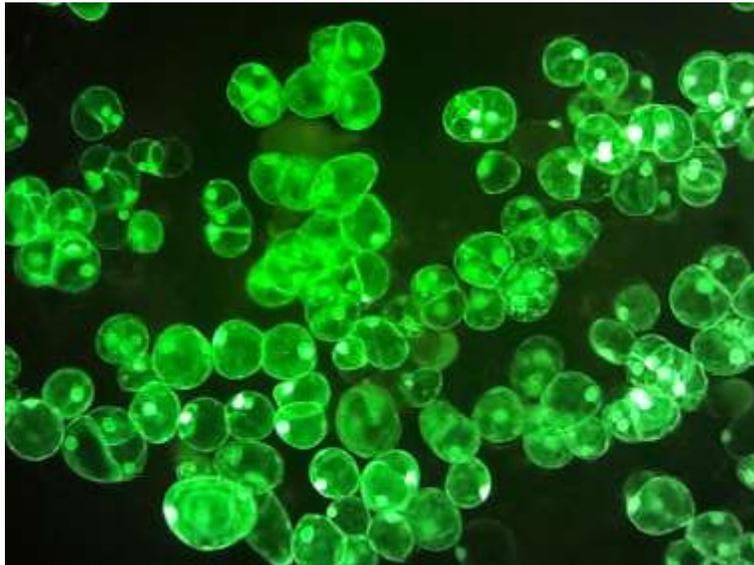


Figura 7.22. Células desdiferenciadas del callo formado, que se observan al microscopio electrónico invertido, mediante la técnica de reacción con acetato de fluoresceína. Las células se muestran de forma esférica con color verde brillante.

8. DISCUSION

Como se revisó a detalle, la enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurológica degenerativa que afecta a más de 46 millones de personas alrededor del mundo y se caracteriza por una pérdida progresiva de memoria y funciones cognitivas. La EA representa el tipo de demencia más común en los adultos mayores y cursa con una alteración grave en la memoria y en la funcionalidad de la persona (World Alzheimer Report 2019). Tomando en cuenta datos tan relevantes donde se estima que 46.8 millones de personas en el mundo viven con demencia y que se calcula que cada 20 años este número duplicará ocasionando que la cifra aumente a 131.5 millones para el año 2050 se puede discutir que se trata de una enfermedad de impacto mundial, la cual cada vez toma mayor importancia, dada las cifras de incidencia y prevalencia que van en aumento cada año. Adicionalmente el tema de la edad y la vejes es un factor sustancial para el desarrollo de este padecimiento. Según la literatura los datos arrojan que la población de adultos mayores de 60 años va en aumento, pues en el 2012, la población mundial de personas mayores de 60 años fue de 800 millones (11%); en el año 2030 habrá 1.4 billones (16%) y para el año 2050 se calcula será de más de 2 billones (22%). Si revisamos la enfermedad de Alzheimer en cifras de costos, también existe un impacto muy relevante pues los costos globales de la demencia han aumentado de 604 billones de dólares en 2010 a 818 billones de dólares en 2015 (World Alzheimer Report, 2019). Estas cifras resaltan la importancia de desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos apropiados que pudieran retrasar el avance de la enfermedad.

Como se mencionó anteriormente la EA es el tipo de demencia más común a nivel mundial es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, caracterizado clínicamente por un paulatino deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales, que se traduce en pérdida de la memoria e incapacidad del individuo afectado para realizar por sí mismo las actividades vitales rutinarias; puede presentarse también un cuadro de ansiedad, irritabilidad, depresión o alucinaciones. Esta información es importante ya que esta incapacidad de los pacientes conlleva a la contratación de empleados como cuidadores domésticos, lo que aumenta el costo de la enfermedad.

Por otro lado, es importante recordar que si examinamos los tratamientos terapéuticos actuales para la EA, en la actualidad no existe ningún tratamiento curativo para la misma. El tratamiento

farmacológico aprobado se limita a disminuir síntomas específicos y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por esta razón es realmente vital enfocarse en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas debido a que es un hecho necesario y de gran relevancia para esta población de pacientes. Los tratamientos actuales aprobados por la FDA están clasificados en dos tipos, los Moduladores de la transmisión glutamatérgica denominados antagonistas de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) en el cual se encuentra la memantina y los más usados los Anticolinesterásicos también denominados inhibidores de la acetilcolinesterasa (iAChE) donde se encuentran la tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina, cabe mencionar que la Tacrina no se prescribe regularmente, debido a que ocasiona toxicidad en el hígado. También existen otros agentes que en la actualidad se encuentran en la fase de experimentación algunos sin resultados relevantes. Analizando este esquema, en realidad son pocos los tratamientos que existen para el manejo del Alzheimer, por lo que la investigación de nuevas fuentes para el desarrollo de fármacos prometedores para el tratamiento de Alzheimer cobra mucha relevancia. Algunas de estas fuentes son las plantas, debido a que son usadas mundialmente en la medicina tradicional, muchos fármacos para el tratamiento de diversos padecimientos incluyendo la EA han sido obtenidas a través de estas, de hecho varios de estos fármacos iAChE son de origen natural. Con respecto a esto, actualmente existe un alcaloide denominado huperzina A (HupA) extraído por primera vez en china desde hace décadas, este se descubrió en la planta medicinal *Huperzia serrata*, esta molécula tiene actividad anticolinesterásica y se encuentra en plantas del género *huperzia* y *phlegmariurus* de la familia de las licopodiales.

La HupA ha demostrado actividad anticolinesterásica debida a la inhibición altamente eficaz, poco tóxica, reversible y altamente selectiva de la acetilcolinesterasa (AChE), que se puede usar para tratar la miastenia gravis, mejorar el aprendizaje y mejorar la función de la memoria en los ancianos. Actualmente el mundo ha incluido a la huperzina A como la segunda generación de los inhibidores de la acetilcolinesterasa y se considera un medicamento con licencia contra la enfermedad de Alzheimer en China y está disponible como nutracéutico en los EE. UU.

Debido al valor medicinal de *H. serrata* y de plantas de la misma familia que contienen HupA como la lycophyta *P. taxifolius*, las perspectivas para la utilización de este recurso vegetal son muy atractivas. Debido a la naturaleza limitada de los recursos silvestres de este tipo de plantas, la recolección incontrolada está destinada a causar el agotamiento de la especie. Por

lo tanto, es particularmente necesario desarrollar estrategias biotecnológicas para la rápida propagación plantas licopodiales que contienen este alcaloide AChE HupA como alternativa en el tratamiento de la EA.

Es importante mencionar que la lycophyta *Huperzia taxifolius* recientemente reclasificada como *Phlegmariurus taxifolius* ha demostrado poseer el alcaloide HupA. Como se menciona se sabe que la huperzina A y B tienen una fuerte inhibición de la actividad de la colinesterasa, mejorando el aprendizaje y la memoria además de en ancianos se nota gran mejoría de la función de memoria y pueden usarse para tratar la miastenia gravis. En vista de su importante valor medicinal, la investigación de las plantas de esta familia ha sido ampliamente reconocida. En los últimos años, las personas se han dado cuenta de que la huperzina A contenida en *Huperzias* y *Phlegmariurus* tiene una alta actividad anticolinesterasa y tiene un buen efecto curativo en el tratamiento de la memoria, el tratamiento de la demencia de mediana edad y la miastenia gravis, y tiene pocos efectos secundarios tóxicos. La perspectiva es amplia, por lo que la planta está recibiendo cada vez más atención. Sin embargo, debido a los recursos dispersos de *Phlegmariurus taxifolius* y muchas áreas de producción relativamente concentradas se encuentran en reservas naturales y áreas escénicas. Al mismo tiempo, *P. taxifolius* es una hierba pequeña perenne de crecimiento lento, y la tasa neta anual de crecimiento de la biomasa es muy limitada. Crece hasta convertirse en una plántula con una altura de 12 cm. Lleva entre 6 y 7 años en condiciones naturales. El período de renovación de recursos es largo y no se puede explotar a gran escala. Por lo anterior, se necesita con urgencia estudios fitoquímicos, biológicos y farmacológicos aunado a estrategias biotecnológicas de cultivo *in vitro* eficaz para la generación de callos de *Huperzia serrata*.

En México crecen aproximadamente 15 especies de licopodios, incluyendo *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, por lo que se ha motivado a la investigación en la búsqueda de nuevos alcaloides anticolinesterásicos en esta familia de plantas, potencialmente útiles en el tratamiento del Alzheimer, una vez que muchos alcaloides inéditos han sido continuamente aislados e identificados a partir de especies de licopodios (Ma *et al.*, 2007). Dentro de este grupo de licopodios también se encuentra *Phlegmariurus taxifolius*, el cual carece de estudios fitoquímicos, biológicos y farmacológicos, además que esta planta se encuentra en peligro vulnerable de extinción. Por tal razón, la biotecnología vegetal es una alternativa prometedora para la conservación de las especies de licopodios y de estrategias para la búsqueda de nuevas fuentes y procesos de producción de huperzina A.

Phlegmariurus taxifolius es considerada una fuente prometedora para la búsqueda de huperzina A, ya que en estudios fitoquímicos se ha logrado identificar este alcaloide en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la UAEM. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación tuvo como objeto establecer una línea de callos de *P. taxifolius* productora de huperzina A, a partir de la utilización de diferentes sistemas de cultivo, fitorreguladores, condiciones de pH, luz y oscuridad. Las ventajas de este tipo de cultivo, es que los callos tienen una velocidad de crecimiento mucho mayor que la planta silvestre, ya que la misma puede tardar cerca de 15 años en crecer, por lo que este sistema biotecnológico *in vitro* ofrece ventajas para la producción del alcaloide huperzina A.

El trabajo derivado en este estudio doctoral generó una solicitud de patente para la inducción de callogenesis de la planta mexicana *Phlegmariurus taxifolius* para la producción del alcaloide anticolinérgico HupA. La importancia radica en que como se mencionó la enfermedad de Alzheimer es un padecimiento que va en crecimiento en las próximas décadas, además de que la población geriátrica va en aumento y actualmente existen pocos tratamientos farmacológicos efectivos, por esta razón es importante buscar nuevas fuentes de compuestos como la HupA para el tratamiento de esta enfermedad, además de que se han popularizado las licophytas que contienen este alcaloide, lo que ha conllevado a colocar a varias de estas plantas licopodiales como vulnerables, en peligro y en peligro crítico de extinción. Por tal motivo la búsqueda de estrategias biotecnológicas para la producción de la HupA y de compuestos derivados activos se justifica ampliamente. También es necesario mencionar que *P. taxifolius* y plantas de esta familia son de crecimiento lento, por lo que cultivarlas *in vitro* y potenciar su producción con la generación de callos altamente productores de HupA y compuestos activos es otra ventaja de la Biotecnología.

Existen pocos trabajos de investigación de *P. taxifolius*, en los cuales esta planta carece de investigación biotecnológica como el cultivo *in vitro* e inducción a callogenesis. Por otro lado, también en cuestión de patentes son escasas para esta familia y específicamente para esta especie.

Se revisaron las patentes asociadas a este trabajo y se encontraron 2 parecidas, pero de la planta *Huperzia serrata*, la cual es la más investigada de esta familia. En la solicitud de patente

CN106613938 (Hu et al., 2017) se presenta un método de cultivos de callos de *Huperzia serrata* (plantas locales chinas) en el cual proponen diversas variables para el cultivo *in vitro* y generación de callos, tales como: diferentes fitorreguladores, luminosidad y temperatura. Sin embargo, las plantas de la familia Lycopodiaceae, principalmente las especies de los géneros *Phlegmariurus* y *Huperzia*, presentan complicaciones como la oxidación, cambios en el pH entre otras causando muerte celular lo que dificulta la inducción de callogénesis. Debido al potencial de aplicación médica y de explotación comercial de *Phlegmariurus taxifolius*, la presente patente propone un método eficiente de inducción a la callogénesis para esta especie vegetal endémica mexicana. En este trabajo se probaron otras variables como: un abanico de pH, respuesta a fitorreguladores, enriquecimiento de nutrientes y protección con un antioxidante natural en los medios de cultivo, luz constante, así como la determinación de la mejor condición de callogénesis corroborada mediante de viabilidad celular. Otra solicitud de patente que involucra estos licopodios, es la CN101658124 (Zhonghua y Xiaoxia, 2010). Se trata de un método de propagación rápida de *Huperzia serrata* que desarrolla un cultivo *in vitro*, pero a nivel de sustrato hidropónico con un medio acuoso. Si bien esta tecnología es rentable, presenta problemas de contaminación por el tipo de medio de cultivo, además de que la extracción de los compuestos de interés es complicada y cara. Para el cultivo de callos, la producción de biomasa no solo es controlada y homogénea, sino que también acumula el metabolito bioactivo de interés, huperiza A.

Es importante mencionar que las especies de *Phlegmariurus* carecen de un sistema de producción biotecnológico de biomasa y metabolitos activos, además de que su gran mayoría, incluyendo *P. taxifolius* se encuentra vulnerable y en peligro de extinción.

Phlegmariurus taxifolius antes clasificada como *Huperzia taxifolia* es una planta de gran importancia en la medicina como una candidata idónea para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). Inicialmente en *H. serrata* se encontró el alcaloide anticolinesterásico huperzina A y esta se usa ampliamente en la Medicina tradicional china, popularizando a plantas de la misma familia por lo que esto representa una gran explotación de la planta, lo que puede provocar riesgo de exterminio. Por esto es importante la intención de reproducirla en condiciones de cultivos *in vitro* y buscar estrategias de producción de sus metabolitos secundarios bioactivos, como la inducción a callogénesis.

La planta *P. taxifolius* carece de estudios químicos. La recolección de la planta se llevó a cabo en Veracruz. Se realizó la extracción mediante secado, trituración y maceración, y posteriormente el fraccionamiento de los extractos metanólicos de las frondas. Se usó metanol ya que es un disolvente que extrae una amplia gama de compuestos de características polares y poco polares, y largamente utilizado en análisis químico-farmacológico.

Se identificaron alcaloides en los extractos etanólicos y fraccionadas de las frondas de de la planta mediante reactivos como Wagner, Mayer y Dragendorff. (Wagner *et al.*, 1984; Harborne, 1973; Stahl, 1973; Domínguez, 1979). Primero se hicieron pruebas de identificación por precipitación con estos reactivos, y después se obtuvieron por extracción alcalina de los alcaloides.

Para el análisis fitoquímico se partió con 121 g de material vegetal seco de los frondes de *Phlegmariurus taxifolius*, el cual se desgrasó con hexano y se extrajo con metanol. Para la obtención de un mayor rendimiento se extrajo cinco veces y adicionalmente se realizó un proceso de sonicación. Se obtuvo un rendimiento de 11.1 g de extracto metanólico, lo que equivale al 9.2% en peso seco. Antes de realizar la extracción de alcaloides totales primero se hicieron pruebas de identificación de alcaloides en el extracto metanólico. Se realizó una CCF de este extracto, la placa fue revelada con reactivo de Dragendorff. Esta prueba demostró la presencia de alcaloides en el extracto metanólico, por lo que posteriormente se realizó la extracción ácido-base (Wu & Gu 2006), para la obtención de alcaloides totales, en el cual se obtuvieron 1.36 g. Esto significó el 1.12% de rendimiento con respecto al peso del material vegetal seco y el 12.3% con respecto al extracto metanólico. Es un rendimiento bajo de alcaloides totales que está produciendo la planta, lo que hace relevante el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* y la inducción a callogénesis logrando establecer las condiciones para el aumento de la producción de los compuestos de interés, en este caso alcaloides con efecto anticolinesterásico como la HupA. Adicionalmente *P. taxifolius* es de crecimiento lento hasta 7 años y algunas se encuentran catalogadas como vulnerable y en peligro de extinción según la UICN.

Es de suma importancia mencionar que el análisis fitoquímico para *P. taxifolius* se realizó a partir de una pequeña cantidad de material vegetal fresco (213 g), con respecto a otros estudios fitoquímicos donde usan kilogramos de material vegetal fresco. El material vegetal fresco se desecó a temperatura ambiente y se logró obtener 121 g de material vegetal seco

equivalente al 56.8% de rendimiento. Fue limitada la cantidad de material vegetal seco con la que se partió para la separación cromatográfica, aunado a un bajo rendimiento de alcaloides totales (1.36 g) para todo el análisis fitoquímico donde se realizó la purificación de tres compuestos y un total de 18 CCA's lo que conllevó a fraccionamientos con bajos rendimientos. Esto limitó la continuidad de posteriores análisis para la elucidación estructural. La razón de todo lo anterior se debe a que *P. taxifolius* tiene un crecimiento lento entre 6-7 años para alcanzar 12cm de longitud, además de que en su hábitat se encuentran pocos especímenes. La recolección masiva en grandes cantidades de la planta puede implicar la devastación de la especie lo que la coloca como vulnerable y en peligro de extinción. Por esta razón se partió con una cantidad limitada de material vegetal fresco.

Para el estudio fitoquímico se realizó el aislamiento y purificación de 3 compuestos denominados T1, T2 y T3 mediante el uso de técnicas de separación como la Cromatografía en columna abierta (CCA) y la cromatografía en capa fina (CCF). Se realizó la primera columna (CCA1) a partir de 1.36g del extracto de alcaloides totales obteniéndose 14 fracciones de columna de las cuales casi todas fueron sometidas a posteriores separaciones cromatográficas. Cabe destacar que las fracciones 2.1, 2.2, 3, 4, 11, y 13 se les realizó un seguimiento más detallado, debido a que eran fracciones con los mayores rendimientos, presentaron actividad anticolinesterásica relevante, poseían un factor de retención similar a la huperzina A, o contenían compuestos de interés.

La purificación del compuesto T1 (figura 7.3 y 7.5) fue llevada a cabo a partir de las fracciones 3 y 4 (CCA1) mediante una serie de fraccionamientos por columna abierta (CCA2, CCA3, CCA4 y CCA5). La fracción 3 (14.8mg) de la CCA1 se separó mediante la CCA2, obteniéndose casi puras las subfracciones 4 y 5. Por otro lado, 29.5mg de la fracción 4 (CCA1) se separó mediante la CCA3, donde la subfracción 4 (10mg) presentó un factor de retención similar al de las subfracciones 3 y 4 (CCA2) (figura 7.4). Por esta razón la subfracción 4 (CCA3) se sometió a la CCA4 para su purificación, de esta columna la subfracción 2 (2.4mg) se juntó con las subfracciones 4 y 5 (CCA2) antes mencionadas para hacer finalmente la purificación del compuesto T1 (1.4mg).

Para el caso de la purificación del compuesto T2 (sección 7.1.2.2, figura 7.7) se llevaron a cabo 3 separaciones cromatográficas (CCA6, CCA7 y CCA8). Se partió de la fracción 2.1 (500mg) (CCA1) que fue sometida a la CCA6, de la cual la subfracción 8 (44mg) con el

segundo mejor rendimiento y con un factor de retención al de la HupA (figuras 7.7 y 7.8) fue elegida para continuar con el seguimiento de separación cromatográfica (CCA7). En esta columna se obtuvieron 6 subfracciones de las cuales, por afinidad química se juntaron de la 3 a la 5 (figura 7.9). En las tres subfracciones se observó un compuesto en común y casi puro, por lo que posteriormente se realizó la CCA 8 en la cual se observó pura la subfracción 4 (figura 7.10) la fue denominada como compuesto T2).

*Para los compuestos T1 y T2, los rendimientos obtenidos fueron muy bajos para los posteriores estudios de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono trece. Debido a que no se pudo obtener información suficiente para la elucidación estructural de los compuestos puros.

En la purificación del compuesto T3, se partió de la subfracción 2 (32.8mg) de la CCA6 (sección 7.1.2.3., figura 7.11). Esta subfracción mostró un compuesto muy notorio en la placa cromatográfica (figura 7.12) por lo que se realizó posteriormente la CCA9, en la cual se obtuvo pura la subfracción 3 con un rendimiento de 9.3mg (figura 7.13). Esta subfracción cromatográfica se denominó compuesto T3, la cual fue sometida a estudios de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-H¹) y de carbono trece (RMN-C¹³). Debido a que se obtuvo un rendimiento casi cercano a 10mg, se pudo elucidar la estructura molecular. Se trata al parecer de un compuesto nuevo y no reportado. La estructura propuesta es de un triterpénico del tipo serratano (figura 7.15-17) el cual se puede confirmar su estructura molecular con estudios de RMN bidimensionales. Es de suma importancia mencionar que triterpenos del tipo serratano han sido reportados en plantas de la misma familia lycopodial de *P. taxifolius*, pero se debe resaltar que en esta planta específicamente no se han reportado compuestos triterpénicos de este tipo, por lo que esta investigación aportará información primordial para el estudio de esta especie vegetal.

Las fracciones 11 y 13 (sección 7.1.2.4., figura 7.14) de la CCA1, según el estudio anticolinesterásico se mostraron activas, por esta razón se les realizó el seguimiento fitoquímico para su separación cromatográfica (CCA10y 11). Cabe mencionar que se partió de la fracción 11 (39.7mg) la cual se sometió a la CCA 10, y la fracción 13 (28.7mg) se le realizó la CCA 11. Para tales fracciones los sistemas de elución probados no fueron eficaces, además de que los rendimientos obtenidos fueron bajos (figura 7.14). Por tal motivo no se pudo continuar con posteriores separaciones cromatográficas para la purificación de sus

compuestos bioactivos. En cuanto a la actividad anticolinesterásica se utilizó el método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), este es uno de los métodos más utilizados para la determinación de la AChE, el cual detecta la aparición de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ACh) por la colinesterasa. La tiocolina reacciona con el cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), para producir un compuesto de color amarillo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm. Las fracciones de columna (CCA1) fueron evaluadas en cuanto a la actividad anticolinesterásica, encontrándose que las fracciones 11 y 13 presentaron un porcentaje de inhibición enzimática más significativo del 75.17% y 73.81% respectivamente a una concentración de 50 µg/mL.

Para el caso del cultivo *in vitro* de *P. taxifolius*, la formación de callos a partir de explantes (tallos) axénicos fueron conseguidos utilizando la combinación del tratamiento número 6 del diseño experimental PB (Tabla 6.3) que consistió en medio B5 modificado adicionado con ANA (0.5 mg/ml) y zeatina (0.5 mg/mL), a un pH 5.5 y luz constante. Los callos fueron identificados a los 30 días de iniciar dicho tratamiento con un tamaño de 1 cm de diámetro. Estos callos fueron friables de forma nodular, de color beige, sin agua alrededor y compacto en su totalidad, así como no embriogénicos, como se muestra la Figura 7.21. La viabilidad de los callos obtenidos fue determinada por el método de diacetato de fluoresceína antes descrito (Figura 7.22). Como se ha mencionado en los antecedentes de este trabajo, existen pocos artículos de cultivo *in vitro* de especies de la familia *Lycopodaceae*. Esto puede ser debido a que este tipo de plantas son plantas inferiores Lycophytas (Pteridofitas), las cuales se reproducen a través de la germinación de sus esporas. A diferencia de las plantas con semilla (plantas superiores) las lycophytas son plantas con mayor grado de dificultad para realizar cultivos *in vitro* y su posterior micropropagación. El inconveniente inicial es la obtención de cultivos axénicos ya que si no se realiza una adecuada desinfección de los explantes la contaminación dificulta poder continuar el cultivo *in vitro* y la micropropagación. Es necesario contar con explantes axenicos para la inducción a callogénesis cumpliendo con las condiciones de esterilidad adecuadas. Para este caso, existen muy pocos trabajos publicados en plantas de este tipo, los escasos trabajos publicados son del género *Huperzia* y en menos cantidad para *Phlegmariurus*. Cabe destacar que estos trabajos presentan protocolos poco claros de desinfección, cultivo *in vitro* e inducción a callogénesis, incluyendo agentes desinfectantes, formulación de los medios de cultivo, adición de fitorreguladores y las condiciones de cultivo como la temperatura, pH e iluminación. En este trabajo doctoral se probaron todas esas

condiciones antes expuestas. Se realizó el establecimiento de un protocolo de desinfección donde se probaron una amplia variedad de agentes desinfectantes, mezclas y variación en las concentraciones, así como el tiempo de exposición a los desinfectantes y la adición de estos a los medios de cultivo. Todos estos factores se analizaron en ensayos que fueron realizados por triplicado hasta la elección del tratamiento más óptimo donde se obtuvieron los explantes axénicos. Otro factor importante fue que el medio elegido no produjera oxidación o muerte de los explantes. Inicialmente se usaron algunos antibióticos como antibacterianos y antifúngicos, además de hipoclorito de sodio, etanol etc., en todos esos casos cuando al fin se lograba eliminar los agentes patógenos los explantes se oxidaban y morían. El uso del agente desinfectante PPM fue de gran ayuda, debido a que a partir del uso de este, se estandarizaron los tratamientos de desinfección. Adicionalmente este agente se adicionó a los medios de cultivo a diferentes concentraciones y se analizó el tiempo de exposición hasta encontrar el tratamiento adecuado donde los explantes fueran axénicos. Adicionalmente se analizó la viabilidad celular de los explantes, cual fue medida mediante el diacetato de fluoresceína y observada al microscopio. Los explantes axénicos viables fueron elegidos para el siguiente protocolo de inducción a callogénesis. También se analizaron los componentes de los medios de cultivo para la formulación de un medio B5 modificado óptimo para realizar el modelo Plackett Burman para inducción a callogénesis. Este procedimiento fue apoyado en el uso de un diseño Plackett Burman el cual arrojó un experimento de 12 tratamientos usando diversos fitorreguladores como ANA, 2,4-D y zeatina en ciertas condiciones de luz y pH. Se logró producir células desdiferenciadas mediante este modelo PB donde posteriormente los callos fueron analizados mediante la viabilidad celular con DAF. Paralelamente Soto en el 2016 analizó estas líneas de células desdiferenciadas generadas en este trabajo y demostró la presencia del alcaloide huperzina A. Finalmente en este trabajo doctoral se generó una solicitud de patente del protocolo de inducción a callogénesis la cual se presenta al final de este documento y se pretende hacer otra solicitud para el protocolo de desinfección.

9. CONCLUSIONES

- Se identificó la presencia de alcaloides en *P. taxifolius* y se usó el método de extracción donde se obtuvo mejor rendimiento.
- La presencia de alcaloides en la planta es baja, debido a que su rendimiento es menor al 1%.
- Se encontró que las fracciones 2.1 y 2.2 (CCA1) presentan un factor de retención similar al de la huperzina A (figura 7.6).
- Los sistemas de elusión que mejor funcionaron fueron mezcla de CHCl_3 :MetOH:H₂O, CHCl_3 :acetona y CHCl_3 : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ usados en las separaciones cromatográficas mediante CCA y CCF.
- Las fracciones 1, 2.1, 2.2, 11-14 (CCA1) fueron las que obtuvieron mejores rendimientos.
- Debido a que las fracciones 11-14 (CCA1) de mayor rendimiento que mostraron la presencia de alcaloides, se utilizaron para el ensayo enzimático de inhibición de la acetilcolinesterasa.
- Las fracciones 11, 13 y 14 (CCA1) mostraron una inhibición de la AChE mayor al 70% (tabla 7.2).
- La fracción 11 (CCA1) presentó mejor actividad biológica con el 75.17% de inhibición enzimática (tabla 7.2).
- Se aisló y purificó un compuesto T3 que según RMN (Figuras 7.15 y 7.16) se trata de una molécula de origen triterpénico (Figura 7.17) del tipo serratano a partir de la fracción 2.1 (Figura 7.11).
- Se estandarizaron los tratamientos de desinfección 28-43 en los cuales el mejor agente desinfectante fue el PPM.

- Los tratamientos de desinfección 35-37 fueron los más óptimos para la obtención de explantes y pinas estériles de *P. taxifolius* debido a que no se presentó contaminación fúngica ni bacteriana.
- Los tratamientos de desinfección en los que se probó el PPM al 2% y con la concentración más baja de desinfectante en el medio (35-37) y con 0.5% de PPM en los medios en 5 días de exposición, resultó ser muy exitoso debido a la nula contaminación de los explantes.
- Gracias al modelo Plackett Burman se pudo obtener una línea de callos de *P. taxifolius*
- Se logró encontrar el medio ideal de cultivo para la generación de las células desdiferenciadas de *P. taxifolius*.
- El medio de cultivo modificado B5 exitoso para la generación de los callos fue un medio a un pH de 5.8.
- La adición del agua de coco sirvió como antioxidante natural y como adición de nutrientes.
- La temperatura óptima de cultivo fue a 25°C.
- Se logró establecer las condiciones de cultivo como luminosidad y oscuridad, encontrándose que la generación de los callos fue a luz constante.
- En reportes adicionales (Soto 2016) se logró identificar la presencia de la huperzina A en los callos de *P. taxifolius*, lo que realza la importancia de esta línea de células desdiferenciadas para futuros estudios científicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

A

ADI Report (2015) Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y. T., & Prina, M. (2019). World Alzheimer report 2015: the global impact of dementia. London: Alzheimer's Disease International; 2015.

ADI Report (2016) Price, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., & Karagiannidou, M. (2019). World Alzheimer Report 2016 Improving Healthcare for People Living with Dementia [Internet]. Illinois: Alzheimer's Disease International; c2016.

ADI Report (2019) Alzheimer's Disease International. (2019). World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia.

Ahmed, M., Azam, K., & Nur, M. (2014). Traditional knowledge and formulations of medicinal plants used by the traditional medical practitioners of Bangladesh to treat schizophrenia like psychosis. *Schizophrenia research and treatment*, 2014.

Akram, M., & Nawaz, A. (2017). Effects of medicinal plants on Alzheimer's disease and memory deficits. *Neural regeneration research*, 12(4), 660.

Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Maldonado-Miranda, J. J., Castillo-Pérez, L. J., Carranza-Álvarez, C., Solano, E., ... & Ruiz-Padilla, A. J. (2017). Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *Journal of ethnopharmacology*, 198, 81-86.

Alzheimer's Association. (2015). 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 11(3), 332-384.

Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 321-387.

Anh, B. T., Sang, G. X., Dat, T. T. H., Huong, H. T., & Thanh, N. D. (2019). A study on vegetative propagation of *Huperzia serrata* by cuttings in Sa Pa, Lao Cai. *TAP CHI SINH HOC*, 41(3).

Aprahamian, I., Stella, F., & Forlenza, O. V. (2013). New treatment strategies for Alzheimer's disease: is there a hope?. *The Indian journal of medical research*, 138(4), 449.

Arana Labrada, F. (2013). *Callogénesis y establecimiento de suspensiones celulares en el árbol del NIM (Azadirachta Indica, A. JUSS)* (Doctoral dissertation).

Atmane, N., Blervacq, A. S., Michaux-Ferrière, N., & Vasseur, J. (2000). Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the Marsh clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes). *Plant Science*, 156(2), 159-167.

Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.

B

Bao, R., Yin, P., Dai, J., Guo, B., & Wei, Y. (2012). Effects of different media on the transplantation of *Huperzia serrate* (Thunb.) Trev. *African Journal of Agricultural Research*, 7(20), 3-045.

Bao, R., Yin, P., Dai, J., Guo, B., & Wei, Y. (2012). Effects of different media on the transplantation of *Huperzia serrate* (Thunb.) Trev. *African Journal of Agricultural Research*, 7(20), 3-045.

Benca, J. P. (2014). Cultivation techniques for terrestrial clubmosses (Lycopodiaceae): conservation, research, and horticultural opportunities for an early-diverging plant lineage. *American Fern Journal*, 104(2), 25-48.

Benca, J. P. (2017). Cultivating the shining firmoss, *Huperzia lucidula* (Michaux) Trevisan (Lycopodiaceae). *Bulletin of the American Fern Society*, 44 (2), 9-15.

Budson, A. E., & Solomon, P. R. (2015). Cap. 16. Cholinesterase inhibitors in *Memory Loss, Alzheimer's disease, and dementia e-book: A practical guide for clinicians*. Elsevier Health Sciences.

Burris, J. N., Mann, D. G., Joyce, B. L., & Stewart, C. N. (2009). An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *BioEnergy Research*, 2(4), 267-274.

Bye, A. Lot & J. Fa (Ed.) *Diversidad Biológica de México. Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM, pp. 369-384.

Bye, R., & Linares, E. (2016). Ethnobotany and ethnohistorical sources of Mesoamerica. In *Ethnobotany of Mexico* (pp. 41-65). Springer, New York, NY.

C

Cascales Angosto, M., & González González, P. Factores implicados en la patogénesis de la enfermedad de alzheimer. Estrés oxidativo. Monogr Real Acad Nac Farm [Internet]. 2009 Apr 3 [cited 2013 Aug 24]; 0 (0).

Ching, R. C. (1981) The Taxonomy of Chinese Lycopodiaceae. *Acta Botanica Yunnanica* 3: 1-9.

Christopher P, Murray JL. (2015). Global, regional, and national age & sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, (385) 117-171.

Córdova, A. M., Cobos, M., Imán, S. A., & Castro, J. C. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh" Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*, 5(1), 25-34.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.

D

Damar, U., Gersner, R., Johnstone, J. T., Schachter, S., & Rotenberg, A. (2017). Huperzine A: A promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*, *99*, 57-62.

Davidse, G., Sousa, M., Knapp, S., Moran, C., Riba, R., Chiang, F., y Barrie, F. (1995). Flora Mesoamericana. Vol. 1. Psilotaceae a Salviniaceae. *Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF*.

Davinelli, S., Sapere, N., Zella, D., Bracale, R., Intrieri, M., & Scapagnini, G. (2012). Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2012*.

De Luca, V., Salim, V., Atsumi, S. M., & Yu, F. (2012). Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. *Science*, *336*(6089), 1658-1661.

DeKosky, S. T., & Gandy, S. (2014). Environmental exposures and the risk for Alzheimer disease: can we identify the smoking guns?. *JAMA neurology*, *71*(3), 273-275.

Dey, A., & De, J. N. (2015). Neuroprotective therapeutics from botanicals and phytochemicals against Huntington's disease and related neurodegenerative disorders. *Journal of Herbal Medicine*, *5*(1), 1-19.

Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., & Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology advances*, *35*(2), 178-216.

Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., & Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology advances*, *35*(2), 178-216.

Domínguez X.A. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. México.

E

Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59.

Ellman, G.L., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7:88-95.

Enz, A., Amstutz, R., Boddeke, H., Gmelin, G., & Malanowski, J. (1993). Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Progress in brain research*, 98, 431-431.

Erdogan Orhan, I., Orhan, G., & Gurkas, E. (2011). An overview on natural cholinesterase inhibitors-a multi-targeted drug class-and their mass production. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(10), 836-842.

Ertl, P. (2017). An algorithm to identify functional groups in organic molecules. *Journal of cheminformatics*, 9(1), 36. Estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80:1778–83.

Essa, M. M., Vijayan, R. K., Castellano-Gonzalez, G., Memon, M. A., Braidy, N., & Guillemin, G. J. (2012). Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 37(9), 1829-1842.

F

Fang, L., Gou, S., Fang, X., Cheng, L., & Fleck, C. (2013). Current progresses of novel natural products and their derivatives/analogs as anti-Alzheimer candidates: an update. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(6), 870-887.

Farfán-Santillán, N., Mendoza-Ruiz, A., Pérez-García, B., & Velázquez-Montes, E. (2017). Desarrollo de los gametofitos de especies mexicanas de helechos de la familia Gleicheniaceae. *Revista de Biología Tropical*, 65(3), 939-952.

Ferreira, A., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., & Alves, G. (2016). Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology. *Phytochemistry reviews*, 15(1), 51-85.

Flores Soto, M. E., & Segura Torres, J. E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*, 6(4), 315-326.

G

Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Plant cell cultures. I. *Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Rep*, 50, 151-158.

Gandía, L., Álvarez, R. M., Hernández-Guijo, J. M., González-Rubio, J. M., De Pascual, R., Rojo, J., & Tapia, L. (2006). Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*, 42(8), 471-477

García, A. Á., & Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).

Garg, S., Timm, T., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., & Wang, Y. (2011). Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiology of aging*, 32(1), 1-14.

Garre-Olmo J. (2018) Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Rev Neurol* 2018; 66: 377-86.

Gauthier S, Loft H, Cummings J. Improvement in behavioral symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008; 23: 537-545.

GPC, (2017), Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer, IMSS: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/393GER.pdf>

Gutierrez-Robledo, L. M., Garcia-Pena, M. C., Roa-Rojas, P., & Martínez-Ruiz, A. (2017). La enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud. *Documento de postura. CONACyT, Academia Nacional de Medicina de México, México.*

H

Hampel, H., Frank, R., Broich, K., Teipel, S. J., Katz, R. G., Hardy, J., ... & Sanhai, W. R. (2010). Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nature reviews Drug discovery*, 9(7), 560.

Harborne JB. (1973). *Phytochem Methods*. London, New York.

Hasegawa, M. (2016). Molecular mechanisms in the pathogenesis of Alzheimer's disease and tauopathies-prion-like seeded aggregation and phosphorylation. *Biomolecules*, 6(2), 24.

He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C. X., & Schuchman, E. H. (2010). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 31(3), 398-408.

Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010–2050).

Hoffman, F. A. (2015). Botanicals as “new” drugs: US development. *Epilepsy & Behavior*, 52, 338-343.

Howes M; Houghton P (2012) Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 9,1, 67-85.

Hu, S., Zhang, L., Zheng, M., Mao, W., Du, J., Yu, J. (2017). Effective *Huperzia serrata* callus culture method. Solicitud de Patente China N° CN106613938 A.

I

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173.

Imperatto F. (2001). Bioactive natural products from Pteridophyta. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 5: 191-228.

Ishiuchi, K. I., Park, J. J., Long, R. M., & Gang, D. R. (2013). Production of huperzine A and other Lycopodium alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and in vitro. *Phytochemistry*, 91, 208-219.

Itzhaki, R. F. (2014). Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: increasing evidence for a major role of the virus. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 202.

J

Jaramillo Reyes, I., Pérez-García, B., & Mendoza Ruiz, A. (2003). Morfogénesis de los gametofitos de especies mexicanas de *Pleopeltis* (Polypodiaceae, subfamilia Pleopeltoideae). *Revista de biología tropical*, 51(2), 321-332.

Jaramillo, I. R., & Perez-Garcia, B. (1994). Morfología y estrategias reproductivas del gametofito de *Polypodium lepidotrichum* (Fée) Maxon (Polypodiaceae). *Acta Botánica Mexicana*, (28), 71-78.

Jiang, F., Feng, Z., Liu, H., & Zhu, J. (2015). Involvement of plant stem cells or stem cell-like cells in dedifferentiation. *Frontiers in plant science*, 6, 1028.

K

Klein, W. L. (2002). A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry international*, 41(5), 345-352.

Kogan, M., & Jeong, H. S. (2018). *Alzheimer Disease. Integrative Medicine*, 95–107.e4. doi:10.1016/b978-0-323-35868-2.00011-6 .

Koynova, R., & Tenchov, B. (2018). Natural product formulations for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: a patent review. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 12(1), 23-39.

L

Lakhan, S. E., Caro, M., & Hadzimichalis, N. (2013). NMDA receptor activity in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in psychiatry*, 4, 52.

Li, W., Howard, J. D., & Gottfried, J. A. (2010). Disruption of odour quality coding in piriform cortex mediates olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Brain*, 133(9), 2714-2726.

Liang, J., Li, J., Jia, R., Wang, Y., Wu, R., Zhang, H., ... & Xu, Y. (2018). Identification of the optimal cognitive drugs among Alzheimer's disease: a Bayesian meta-analytic review. *Clinical interventions in aging*, 13, 2061.

Lira, R., Casas, A., & Blancas, J. (Eds.). (2016). *Ethnobotany of Mexico: Interactions of people and plants in Mesoamerica*. Springer.

Liu J., Zhu Y., Yu C. (1986). The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 64: 837-839.

Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., & Cooper, C. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, 390(10113), 2673-2734.

López Locanto, Ó. (2015). Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Archivos de Medicina Interna*, 37(2), 61-67.

M

Ma X., Gang D. (2004) The Lycopodium alkaloids. *Natural Products Reports*, 21:752-772.

Ma X., Tan C., Zhu D., Gang D. (2006). A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:54-67.

Ma X., Tan C., Zhu D., Gang D., Xiao P. (2007). Huperzine A from *huperzia* species-and ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113:15-34.

Ma, X., Jiang, S., Zhu, D. (1998). Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae sensu lato occurring in China and their contribution to classification. *Biochem. Systemat. Ecol.*, 26, 723–728.

Manoharan, S., Essa, M. M., Vinoth, A., Kowsalya, R., Manimaran, A., & Selvasundaram, R. (2016). Alzheimer's Disease and Medicinal Plants: An Overview. In *The Benefits of Natural Products for Neurodegenerative Diseases* (pp. 95-105). Springer, Cham.

Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., & Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 108 (pp. 1-142). Springer, Cham.

Mendez, M. F. (2012). Early-onset Alzheimer's disease: nonamnestic subtypes and type 2 AD. *Archives of medical research*, 43(8), 677-685.

Mercano, D y M. Hasegawa “ Fitoquímica Orgánica” Ed.. Universidad Central de Venezuela, Caracas 1991.

Moreira, P. I., Carvalho, C., Zhu, X., Smith, M. A., & Perry, G. (2010). Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 2-10.

Mortby, M. E., Black, S. E., Gauthier, S., Miller, D., Porsteinsson, A., Smith, E. E., & Ismail, Z. (2018). Dementia clinical trial implications of mild behavioral impairment. *International psychogeriatrics*, 30(2), 171-175.

Moulton, P. V., & Yang, W. (2012). Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Journal of environmental and public health*, 2012.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

N

Nägga, K., Bogdanovic, N., & Marcusson, J. (1999). GABA transporters (GAT-1) in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, 106(11-12), 1141-1149.

Navarrete H., León B., Gonzáles J., Aviles D., Lecaro J., Mellado F., Alban J., Øllgarrd B. (2006). Helechos. *Botânica Econômica de los Andes Centrales*, p. 385- 411.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.

O

Øllgaard, D. (1990). *Lycopodiaceae*. In: Kubitzki, K. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer Verlag, 1a. ed. pp. 404.

OMS (2017): https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/es/

Orhan, I. E., & Senol, F. S. (2013). Alkaloids and inhibitory effects against enzymes linked to neurodegenerative diseases (physostigmine, galanthamine, huperzine, etc.). *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Ramawat, GK, Mérillon, J.-M., Eds*, 1525-1539.

Ortega M., Agnese A., Cabrera J. (2004a). Sauroine- a novel *Lycopodium* alkaloid from *Huperzia saururus*. *Tetrahedron Letters*, v. 45, p. 7003-7005.

Ortega M., Agnese A., Cabrera J. (2004b). Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine*, 11: 539-543.

Ortega M., Vallejo M., Cabrera J., Pérez M., Almirón R., Ramírez O., Agnese A. (2006). *Huperzia saururus*, activity on synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 374-378.

Oviedo, D., Britton, G., & Villareal, A. (2016). Deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer: Revisión de conceptos.

P

Pagani, L., & Eckert, A. (2011). Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011.

Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., & Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, 21(2), 204-207.

Pereira, AB. (2003) *Introdução ao estudo das pteridófitas*. 2. ed. Canoas: Ed. da ULBRA, 192p

Pérez, M. Á. G., Cabeza, M. M., & Campos, G. S. G. (2018). Alzheimer. Antecedentes y Terapias novedosas. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, (29), 17-23.

Porsteinsson AP, Grossberg GT, Mintzer J, Olin JT. Memantine MEM-MD-12 Study Group. Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease already receiving a cholinesterase inhibitor: a randomized, double blind, placebocontrolled trial. *Curr Alzheimer Res*. 2008; 5 : 83-89.

Press, N. J., Joly, E., & Ertl, P. (2019). Natural product drug delivery: A special challenge?. *Progress in medicinal chemistry*, 58, 157-187.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia*, 9(1), 63-75.

Puglia, C., Lauro, M. R., Tirendi, G. G., Fassari, G. E., Carbone, C., Bonina, F., & Puglisi, G. (2017). Modern drug delivery strategies applied to natural active compounds. *Expert opinion on drug delivery*, 14(6), 755-768.

Q

Qian, Z. M., & Ke, Y. (2014). Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease?. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 216.

Ratera E., Ratera M., (1980). *Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular*. Editorial Hemisfério Sur. S.A. Buenos Aires, p. 67.

R

Ren, H., Wang, B., & Zhao, H. (2017). Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. *Current opinion in biotechnology*, 48, 21-27.

Riba R. (1998). Pteridofitas mexicanas: Distribución y endemismo. *In*: T.P.Ramamoorthy, R.

Rincón Baron, E. J., Hilda Rolleri, C., Passarelli, L. M., Espinosa Matías, S., Torres, G., & Marina, A. (2014). Esporogénesis, esporodermo y ornamentación de esporas maduras en Lycopodiaceae. *Revista de Biología Tropical*, 62(3), 1161-1195.

Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., ... & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE TEMPISQUE (*Sideroxylum capiri* PITTIER)/QUALITATIVE IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES AND CYTOTOXICITY DETERMINATION OF TEMPISQUE EXTRACTS (*Sid. Biotecnia*, 18(3), 3-8.

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118.

Rodríguez, J., & Gutiérrez Herrera, R. F. (2014). Demencias y enfermedad de Alzheimer en América Latina y el Caribe. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(3), 378-387.

Rydzewski, J., Jakubowski, R., Nowak, W., & Grubmüller, H. (2018). Kinetics of huperzine A dissociation from acetylcholinesterase via multiple unbinding pathways. *Journal of chemical theory and computation*, 14(6), 2843-2851.

S

Sahoo, A. K., Dandapat, J., Dash, U. C., & Kanhar, S. (2018). Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *Journal of ethnopharmacology*, 215, 42-73.

Sanabria Castro, A., Alvarado Echeverría, I., & Monge Bonilla, C. (2016). Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer.

Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Moleculares. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(2), 76-87.

Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., Eckert, A., & Mensah-Nyagan, A. G. (2006). Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *Journal of neurobiology*, 66(8), 868-881.

Schillmiller, A. L., Last, R. L., & Pichersky, E. (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 702-711.

Singha, K. B., Dutta, C. M., & Mazumder, P. B. (2013). In vitro propagation in pteridophytes: a review. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 4(2).

Soria-López, M., & Fuentes-Páramo, I. (2016). The identification of biopiracy in patents. *World Patent Information*, 47, 67-74.

Soto, D. (2016). Identificación y cuantificación de huperzina A en extractos alcaloides de callos, hongos endófitos y en su planta huésped de *Huperzia orizabae*, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología, 1-89.

Supnet, C., & Bezprozvanny, I. (2010). The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell calcium*, 47(2), 183-189.

Szypula, W. J., Mistrzak, P., & Olszowska, O. (2013). A new and fast method to obtain in vitro cultures of *Huperzia selago* (Huperziaceae) sporophytes, a club moss which is a source of huperzine A. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82(4).

T

Takeda, S., Rakugi, H., & Morishita, R. (2019). Roles of vascular risk factors in the pathogenesis of dementia. *Hypertension Research*, 1-6.

Tang, Y. P., & Gershon, E. S. (2003). Genetic studies in Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 5(1), 17.

Testo, W., Øllgaard B., Field A., Almeida T., Kessler M., Barrington D. (2018). Phylogenetic systematics, morphological evolution, and natural groups in neotropical *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae). *Mol. Phylog. Evol.* 125:1–13.

Tun, M. K. M., & Herzon, S. B. (2012). The pharmacology and therapeutic potential of (-)-huperzine A. *Journal of experimental pharmacology*, 4, 113.

W

Wagner H., Bladt S., Zgainski M. (1984). *Plant Drug Analysis*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.

Wagner w., Beitel J. (1992). Generic classification of modern north American *lycopodiaceae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79:3: 676-686

Wang, C. Y., Wang, T., Zheng, W., Zhao, B. L., Danscher, G., Chen, Y. H., & Wang, Z. Y. (2010). Zinc overload enhances APP cleavage and A β deposition in the Alzheimer mouse brain. *PLoS one*, 5(12).

Wang, X., Su, B. O., Lee, H. G., Li, X., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 29(28), 9090-9103.

Wang, Y., Klunk, W. E., Huang, G. F., Debnath, M. L., Holt, D. P., & Mathis, C. A. (2002). Synthesis and evaluation of 2-(3'-iodo-4'-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole for in vivo quantitation of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 19(1-2), 11-16.

Whittier, D. P. (2006). Gametophytes of four tropical, terrestrial *Huperzia* species (Lycopodiaceae). *American Fern Journal*, 96(2), 54-61.

Whittier, D. P., & Storchova, H. (2007). The gametophyte of *Huperzia selago* in culture. *American fern journal*, 97(3), 149-154.

Whittier, P. (1964). The effect of sucrose on apogamy in *Cyrtomium falcatum* Presl. *American Fern Journal*, 54(1), 20-25.

Whittier, P. (1998). Germination of spores of the Lycopodiaceae in axenic culture. *American Fern Journal*, 106-113.

Whittier, P., & Webster, T. R. (1986). Gametophytes of *Lycopodium lucidulum* from axenic culture. *American Fern Journal*, 76(2), 48-55.

Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, et al. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimer's Dement* 2017; 13: 1-7.

Wu Q, Gu Y. (2006). Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 3: 40(4): 993-8

Wu, S., Fan, Z., & Xiao, Y. (2018). Comprehensive relative quantitative metabolomics analysis of lycopodium alkaloids in different tissues of *Huperzia serrata*. *Synthetic and systems biotechnology*, 3(1), 44-55.

X

Xiao, X. Q., Zhang, H. Y., & Tang, X. C. (2002). Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *Journal of neuroscience research*, 67(1), 30-36.

Xie, T., Song, S., Li, S., Ouyang, L., Xia, L., & Huang, J. (2015). Review of natural product databases. *Cell proliferation*, 48(4), 398-404.

Xu, B., Lei, L., Zhu, X., Zhou, Y., & Xiao, Y. (2017). Identification and characterization of L-lysine decarboxylase from *Huperzia serrata* and its role in the metabolic pathway of lycopodium alkaloid. *Phytochemistry*, 136, 23-30.

Xu, M., Heidmarsson, S., Thorsteinsdottir, M., Wasowicz, P., Sun, H., Deng, T., ... & Olafsdottir, E. S. (2019). Intraspecific Variation of Huperzine A and B in Icelandic *Huperzia selago* Complex. *Planta medica*, 85(02), 160-168.

Xu, M., Heidmarsson, S., Thorsteinsdottir, M., Wasowicz, P., Sun, H., Deng, T. & Olafsdottir, E. S. (2019). Intraspecific Variation of Huperzine A and B in Icelandic *Huperzia selago* Complex. *Planta medica*, 85(02), 160-168.

Y

Yang, G., Wang, Y., Tian, J., & Liu, J. P. (2013). Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PloS one*, 8(9).

Yang, Y. F., Qu, S. J., Xiao, K., Jiang, S. H., Tan, J. J., Tan, C. H., & Zhu, D. Y. (2010). Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*. *Journal of Asian natural products research*, 12(11), 1005-1009.

Yang, Y., Wang, Z., Wu, J., & Chen, Y. (2016). Chemical constituents of plants from the genus *Phlegmariurus*. *Chemistry & biodiversity*, 13(3), 269-274.

Z

Zangara, A. (2003). The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75(3):675–686.

Zhang, F. F., Wang, M. Z., Zheng, Y. X., Liu, H. Y., Zhang, X. Q., & Wu, S. S. (2015). Isolation and characterization of endophytic Huperzine A-producing fungi from *Phlegmariurus phlegmaria*. *Microbiology*, 84(5), 701-709.

Zhang, F., Liu, X., Liu, Y., Wang, Y., & Le, W. (2020) Anti -dementia Medications: Specific Agents.

Zhang, H. Y., Yan, H., & Tang, X. C. (2008). Non-cholinergic effects of huperzine A: beyond inhibition of acetylcholinesterase. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(2), 173-183.

Zhonghua, W., Xiaoxia, S. (2010). Rapid propagation method of *Huperzia serrata*. Solicitud de Patente China N° CN101658124 A.

Zhou, L. G., & Wu, J. Y. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23(5), 789-810.

Zhu, X., Lee, H. G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G., & Smith, M. A. (2005). Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 31(1-3), 205-217.

ANEXO I SOLICITUD DE PATENTE MX/a/2019/014063



IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL



MX/E/2019/080170

MX/a/2019/014063

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES.
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE
PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO
DE PATENTES.

COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE
RECEPCIÓN Y CONTROL DE DOCUMENTOS.

EXPEDIENTE: MX/a/2019/014063

FOLIO DE RECEPCIÓN: MX/E/2019/080170

IDENTIFICADOR DE LA SOLICITUD: 19330

LUGAR, FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN
DE LA SOLICITUD:
CIUDAD DE MÉXICO 25/11/2019 11:30:08

ACUSE DE RECIBO DE LA SOLICITUD DE:

Patente

SOLICITANTE(S) O REPRESENTANTE LEGAL:

JOSE MARIO ORDOÑEZ PALACIOS

DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD:

DOCUMENTO	NOMBRE ARCHIVO	TAMAÑO	HOJA(S)
SOLICITUD	Solicitud_000019330_25_11_2019.pdf	430.19 KB	4
COMPROBANTE DE PAGO	Pago.pdf	24.17 KB	1
HOJA DE DESCUENTO	HOJA DE DESCUENTO.pdf	25.25 KB	1
CONSTANCIA RGP	RGP DR ORDONEZ.pdf	363.84 KB	1
MEMORIA_TECNICA	DESCRIPCIÓN Phlegmariusus taxifolius.pdf	148.27 KB	12
DIBUJOS	FIGURAS Phlegmariusus taxifolius.pdf	354.3 KB	1
OTROS	Cesiones de Derechos.pdf	3790.56 KB	6

TOTAL DE HOJAS: 26 (No se incluyen hoja(s) del acuse)

Bajo protesta de decir verdad declaro, que se encuentra en el supuesto con respecto al beneficio señalado en la Cuarta Disposición General de la Tarifa por los servicios que presta este Instituto, por lo que solicito el 50% de descuento de la tarifa establecida, para los artículos que aplique dicho descuento. Se hace la presente declaración en cumplimiento de dicha disposición, según el acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, publicado en el Diario Oficial de la Federación con fecha 23 de agosto de 1995.

Los documentos adjuntos están sujetos al estudio correspondiente que el Instituto realice de conformidad con la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

La presente solicitud se recibe en términos del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican; por lo tanto, previo a su presentación, el usuario aceptó lo siguiente:

I.- Que el trámite se efectúe, desde su inicio hasta su conclusión, a través de medios de comunicación electrónica;

II.- Bajo protesta de decir verdad, que revisó en la vista previa la información capturada y los anexos a la solicitud y que éstos son correctos; así mismo que, una vez concluido el proceso, no podría editar o variar la información o sus anexos;

III.- Bajo protesta de decir verdad, indicó que la información capturada es cierta;

IV.- Consultar su tablero, al menos, los días quince y último de cada mes, o bien, el día hábil siguiente si alguno de éstos fuere inhábil y que, en caso de no hacerlo, la notificación se tendría por hecha el día hábil siguiente a los días quince y último de cada mes, y

V.- Dar aviso por escrito, a través del correo electrónico buzon@impi.gob.mx, a la Dirección Divisional de Patentes, dentro de los tres días hábiles siguientes a aquel en que se vea imposibilitado, por causas imputables al Instituto, a consultar el tablero o abrir los archivos depositados en el mismo, en los días señalados en la fracción IV anterior.

A efecto de que los documentos presentados a través del Sistema de Patentes en Línea, produzcan los mismos efectos que los documentos firmados autógrafamente y tengan el mismo valor probatorio, manifestó bajo protesta de decir verdad, que los documentos son copia íntegra e inalterada del documento impreso; que se encuentren digitalizados en formato PDF (Portable Document Format), y que los remitió de forma legible.

MÉTODO DE INDUCCIÓN A DESDIFERENCIACIÓN CELULAR DE *Phlegmariurus taxifolius*

CAMPO TÉCNICO

5

La invención pertenece al campo de la biotecnología de plantas y en particular se refiere a técnicas de cultivo *in vitro* de partes aéreas de *Phlegmariurus taxifolius* para la generación y propagación de callos productores de huperzina A.

10

ANTECEDENTES

Las *Pteridofitas* se presentan en una extraordinaria variedad de ambientes, que abarcan zonas árticas y alpinas al interior de florestas pluviales tropicales vegetación arbórea sub-desértica, rocas costeras y manglares. El 80% de las especies se encuentran en áreas tropicales, siendo más comunes en montañas tropicales y subtropicales húmedas. Particularmente, las montañas presentan alta riqueza y endemismo de especies de *Pteridofitas*, que coinciden con regiones montañosas en el Neotrópico (Øllgaard, 1990; Pereira, 2003). La región neotropical concentra importantes áreas geográficas de *Pteridofitas* con cuatro regiones de alta diversidad que reúnen aproximadamente el 40% de especies endémicas: las Grandes Antillas, el sureste de México y América Central, la región de los Andes, el sureste y sur de Brasil, y Argentina. La familia *Lycopodiaceae* incluye 400 especies en el mundo. Son ampliamente distribuidas en zonas tropicales templadas y frías (Zangara, 2003).

25

En 1992 Wagner y Beitel reconocieron que la familia *Huperziaceae* estaba conformada por los géneros *Phlegmariurus* y *Huperzia*. Por muchos años esta clasificación ha sido empleada a nivel mundial; además de la relación quimiotaxonómica marcada por la presencia de un compuesto alcaloideo, empleado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, denominado huperzina A, que ha sido identificado únicamente en estos géneros. Sin embargo, recientemente Testo y colaboradores (2018) propusieron a la subfamilia Huperzioideae, de la familia *Lycopodiaceae*, que está conformada por tres géneros: *Phlegmariurus*, *Huperzia* y *Phylloglossum*. En particular el género *Phlegmariurus* está compuesto por aproximadamente 250 especies y es el más numeroso de la familia; es de amplia distribución y ha sido encontrado desde el nivel del mar hasta 3000 m; son plantas epífitas péndulas, presentan tallos dicotómicos y hojas micrófilas alternadas, con esporangios generalmente solitarios. En el caso particular de *Huperzia taxifolia*, ésta ha sido reclasificada como *Phlegmariurus taxifolius*.

40

Phlegmariurus taxifolius (Sw.) Á. Löve et D. Löve [= *Huperzia taxifolia* (Sw.) Trevis, *Lycopodium taxifolium* Sw.] es una planta epífita, tallos arqueado-decumbentes a péndulos, de hasta 30 cm de largo y 2 a 4 mm de ancho excluyendo las hojas, 2 a 6 bifurcados; con hojas de las divisiones proximales en verticilos alternos de 3 a 4, lineares a lanceoladas, con 13 a 20 mm de largo y 2 a 3 mm de ancho, patentes a ascendentes o algo adpresas, márgenes aplanados a escasamente revolutos. Crecen en Nebliselvas, bosques húmedos y bosques de pino-encinos (900 a 1800 m); de México a Bolivia, las Antillas (Davidse y colaboradores, 1995).

Ma y colaboradores (1998) estudiaron la relación entre los diferentes licopodios y propuso que la presencia de huperzina A se relacionaba quimiotaxonómicamente con algunas especies. Se descubrió que este alcaloide presenta actividad anticolinesterásica muy específica, con importante aplicación en la enfermedad de Alzheimer.

En México crecen aproximadamente 15 especies de licopodios, incluyendo *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, por lo que se ha motivado a la investigación en la búsqueda de nuevos alcaloides anticolinesterásicos en esta familia de plantas, potencialmente útiles en el tratamiento del Alzheimer, una vez que muchos alcaloides inéditos han sido continuamente aislados e identificados a partir de especies de licopodios (Ma y colaboradores, 2007). Dentro de este grupo de licopodios también se encuentra *Phlegmariurus taxifolius*, el cual carece de estudios fitoquímicos, biológicos y farmacológicos, además que esta planta se encuentra en peligro vulnerable de extinción. Por tal razón, la biotecnología vegetal es una alternativa prometedora para la conservación de las especies de licopodios y de estrategias para la búsqueda de nuevas fuentes y procesos de producción de huperzina A.

Phlegmariurus taxifolius es considerada una fuente prometedora para la búsqueda de huperzina A, ya que en estudios fitoquímicos se ha logrado identificar este alcaloide en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la UAEM. Por tal motivo, la presente invención tuvo como objeto establecer una línea de callos de *P. taxifolius* productora de huperzina A, a partir de la utilización de diferentes sistemas de cultivo, fitorreguladores, condiciones de pH, luz y oscuridad. El beneficio de esta invención es que los callos obtenidos tienen una velocidad de crecimiento mucho mayor que la planta silvestre, ya que la misma puede tardar cerca de 15 años en crecer, por lo que este sistema biotecnológico *in vitro* ofrece ventajas para la producción del alcaloide huperzina A.

En la solicitud de patente CN106613938 (Hu et al., 2017) se presenta un método de cultivos de callos de *Huperzia serrata* (plantas locales chinas) en el cual proponen diversas variables para el cultivo *in vitro* y generación de callos, tales como: diferentes fitorreguladores, luminosidad y temperatura. Sin embargo, las plantas de la familia Lycopodiaceae, principalmente las especies de los géneros *Phlegmariurus* y *Huperzia*, presentan complicaciones como la oxidación, cambios en el pH entre otras causando muerte celular lo que dificulta la inducción de callogénesis. Debido al potencial de aplicación médica y de explotación comercial de *Phlegmariurus taxifolius*, la presente patente propone un método eficiente de inducción a la callogénesis para esta especie vegetal endémica mexicana. En la presente invención se prueba otras variables como: un abanico de pH, respuesta a fitorreguladores, enriquecimiento de nutrientes y protección con un antioxidante natural en los medios de cultivo, luz constante, así como la determinación de la mejor condición de callogénesis corroborada mediante de viabilidad celular. Otra solicitud de patente que involucra estos licopodios, es la CN101658124 (Zhonghua y Xiaoxia, 2010). Se trata de un método de propagación rápida de *Huperzia serrata* que desarrolla un cultivo *in vitro*, pero a nivel de sustrato hidropónico con un medio acuoso. Si bien esta tecnología es rentable, presenta problemas de contaminación por el tipo de medio de cultivo, además de que la extracción de los compuestos de interés es complicada y cara. En la presente invención la producción de biomasa no solo es controlada y homogénea, sino que también acumula el metabolito bioactivo de interés, huperiza A.

Es importante mencionar que las especies de *Phlegmariurus* carecen de un sistema de producción biotecnológico de biomasa y metabolitos activos, además de que su gran mayoría, incluyendo *P. taxifolius* se encuentra vulnerable y en peligro de extinción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra el proceso exitoso de callogénesis inducida con el medio de cultivo B5 modificado, donde se observa: **a)** formación de callos, **b)** raquis y **c)** pinas.

La **Figura 2** muestra células desdiferenciadas del callo formado vistas al microscopio electrónico invertido.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 En la presente invención se describe un método eficaz para producir y cultivar callos de la planta *P. taxifolius* utilizando un medio de cultivo B5 modificado con la adición de distintos fitorreguladores y ajuste de diferentes pH, así como las condiciones específicas de cultivo como la elección adecuada de temperatura y luminosidad.

10 Se detalla la metodología para la obtención de callos partiendo de explantes axénicos de *P. taxifolius*, mismos que fueron colocados en medio de cultivo B5 que posteriormente fue modificado. Se evaluaron diferentes medios de cultivo que fueron adicionados con los siguientes fitorreguladores: ácido naftalenacético (ANA), zeatina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido giberélico (GA₃) y ácido indolacético (AIA). Para el siguiente experimento se seleccionaron tres fitorreguladores, siendo
15 que solamente el empleo de los tres primeros fitorreguladores resultaron exitosos. Se analizó el efecto del pH, preparando los medios de cultivo a pH 5.0, 5.5 y 5.8. Al mismo tiempo, estos medios fueron enriquecidos con 20 mL/L de agua de coco estéril. Por otro lado, se incluyó en esta patente el análisis de las condiciones de cultivo como la luz/oscuridad a una temperatura de 25 °C. Es importante mencionar
20 que el diseño experimental que emplea el modelo Plackett-Burman (modelo PB) fue utilizado para la determinación de las composiciones de cada medio de cultivo de acuerdo a las variables antes mencionadas. El medio de cultivo óptimo presentó las siguientes concentraciones de fitorreguladores: ANA y zeatina (0.5 mg/L) a un pH de 5.5. Esta invención aporta un método de cultivo *in vitro* exitoso para la generación y
25 propagación de callos de explantes axénicos de *P. taxifolius*.

MEJOR MÉTODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

30 El presente ejemplo es ilustrativo y no limitativo, ya que un técnico en la materia entenderá que hay variantes que caen dentro del alcance de protección de la presente invención.

35 El objeto de la presente invención es mejorar las deficiencias de las técnicas anteriores y aportar un método eficaz para generar y cultivar callos de *P. taxifolius*.

40 En la presente invención se analiza: 1) la composición de los medios (concentración y combinación de distintos fitorreguladores); 2) ajuste a diferentes pH; 3) enriquecimiento con la adición de agua de coco como antioxidante natural; y 4) las

condiciones de cultivo como luminosidad y temperatura. Esto sugiere la solución técnica específica tratándose de un método eficaz para producir y cultivar callos que comprende los siguientes pasos:

- 5 Paso 1. Se utilizaron explantes axénicos (previamente desinfectados) generados a partir de los tallos (raquis) de los frondes, de los cuales se hacen cortes de *P. taxifolius* aproximadamente de 1 cm x 0.5 cm de longitud, los cuales fueron puestos en medios de cultivo B5 modificado.
- 10 Paso 2. Diferentes medios de cultivo se prepararon de acuerdo al Diseño PB (tabla 1), en el cual se proponen variables como distintos pH (5.0, 5.5 y 5.8); diversos fitorreguladores como ANA, zeatina y 2,4-D; todos los medios fueron enriquecidos con agua de coco. Finalmente, los medios son expuestos en oscuridad o luz constante a 25 °C.
- 15 Paso 3. Los explantes axénicos son puestos en los medios de cultivo antes mencionados y se observan cada tercer día durante un mes hasta encontrar la formación de las células desdiferenciadas.
- 20 En comparación con técnicas anteriores los efectos beneficiosos de la invención son: La presente invención proporciona un método y una tecnología efectiva para la inducción a callogénesis y su cultivo *in vitro* de *P. taxifolius*, un evento sumamente difícil en plantas de este género.
- 25 Formas detalladas: La solución técnica de la presente invención se describe más concretamente a continuación con referencia a procedimientos específicos.

El material vegetal experimental fue obtenido en el mercado del municipio de Coatepec, Veracruz, y fue procesado en el Laboratorio de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM. La planta fue identificada y depositada en el Herbario HUMO de la UAEM con el número de voucher 39243

Ejemplo 1. Medios de cultivo.

- 35 Los explantes axénicos de *P. taxifolius* fueron cultivados primeramente en un medio B5 simple. Para la inducción a callogénesis se analizó la efectividad de diferentes fitorreguladores (ANA 0.5 mg/L, zeatina 0.5 mg/L, 2,4-D 10 mg/L, GA₃ 0.25 mg/L y AIA 0.5 mg/L). Se seleccionaron 3 fitorreguladores (ANA, zeatina y 2,4-D), para llevar a cabo el diseño experimental PB, debido a que presentaron mejor respuesta a las
- 40 condiciones de inducción a la desdiferenciación celular. En esta parte experimental,

el medio de cultivo B5 fue modificado con la siguiente composición: sacarosa 20 g/L, fitagel 4 g/L, polivinilpirrolidona (PVP) 1 g/L, nitrato de potasio (KNO₃) 5 g/L. Todos los medios de cultivo fueron enriquecidos con agua de coco estéril 20 mL/L y fue ajustado el medio a diferentes pH (5.0, 5.5 y 5.8). Los medios fueron esterilizados por separado a 121 °C durante 15 minutos y vaciados bajo condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

Ejemplo 2. Combinaciones Hormonales y diseño del experimento.

De acuerdo con las combinaciones arrojadas por el Diseño PB, se prepararon 12 diferentes medios de cultivo B5 modificado, con las combinaciones hormonales descritas en la Tabla 1 donde el signo positivo (+) indica la presencia de la variable y el signo negativo (-) la ausencia de la misma. Los fitorreguladores previamente seleccionados fueron utilizados en las siguientes concentraciones: ANA 0.5 mg/L, zeatina 0.5 mg/L y 2,4-D 10 mg/L.

Tabla 1. Diseño experimental PB. Fitorreguladores probados para la inducción a callogénesis: ácido naftaleno acético (ANA) 0.5 mg/L, zeatina 0.5 mg/L y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 10 mg/L; ajuste a diferentes pH como 5.0, 5.5 y 5.8. En oscuridad (+) y luz constante (-).

Tratamiento	pH	Oscuridad	zeatina 0.5 mg/L	2,4-D 10 mg/L	ANA 0.5 mg/L
1	5.0	-	-	+	+
2	5.5	-	-	-	-
3	5.0	+	-	-	+
4	5.5	+	-	+	-
5	5.0	-	+	+	-
6*	5.5	-	+	-	+
7	5.0	+	+	-	-
8	5.5	+	+	+	+
9	5.8	-	-	-	-
10	5.8	+	-	+	-
11	5.8	-	+	-	+
12	5.8	+	+	+	+

*El tratamiento 6 propició exitosamente el evento de callogénesis.

Ejemplo 3. Ajuste del pH y enriquecimiento de los diferentes medios de cultivo.

Como se mencionó en los ejemplos 1 y 2, se prepararon 12 combinaciones de acuerdo al diseño del experimento PB utilizando tres fitorreguladores, los cuales

fueron añadidos antes del ajustar el pH de los medios y antes de su esterilización por autoclave, con la finalidad de evitar cambios en el pH y asegurar el pH final seleccionado (5.0, 5.5 y 5.8). En todos los casos, los medios de cultivo fueron enriquecidos con agua de coco (con acción antioxidante natural), que fue esterilizada por un sistema de filtración por membrana (0.2 μm). Esto se llevó a cabo con la ayuda de un soporte de filtro con receptor, bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Una vez esterilizada (filtrada) el agua de coco, fue adicionada a los medios de cultivo. Esto se realizó posterior a la esterilización de los medios en autoclave, encontrándose los medios aún en estado líquido, con una temperatura de ± 30 °C antes de la gelificación. Esto se implementó con la finalidad de evitar la degradación de los nutrientes proporcionados por el agua de coco.

Ejemplo 4. Preparación / Selección de explantes.

Se partió del material vegetal axénico de *P. taxifolius*, del cual se realizaron cortes de los tallos (raquis) de las ramas aéreas de la planta con aproximadamente 1cm x 0.5cm de longitud, en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Estos explantes fueron puestos en los medios de cultivo B5 modificado en diferentes condiciones como lo muestra la Tabla 1.

Ejemplo 5. Condiciones de cultivo en la inducción de callos.

Los explantes axénicos fueron cultivados a una temperatura de 25 °C bajo condiciones de luz y oscuridad constante como se muestra en la Tabla 1. Los explantes fueron observados cada tercer día durante un mes hasta la aparición de los callos.

Ejemplo 6. Determinación de la viabilidad celular.

La viabilidad de los callos se muestra en la Figura 2, la cual fue determinada por un método de fluorescencia (diacetato de fluoresceína, FDA). Método que muestra la integridad de la membrana celular a través de su actividad enzimática que degrada el diacetato de fluorescencia, cuya fluorescencia se observa en el microscopio electrónico invertido. El método constó de 2 stocks. Se prepararon 5 mL del stock 1 con FDA a una concentración de 5 mg/mL usando acetona como disolvente. Para la preparación del stock 2, se tomaron 100 μL del stock 1 en 5 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se mezcla la muestra (células desdiferenciadas) con el stock 2 en una proporción 1:1 (m/v) y se deja reposar durante aproximadamente 2 minutos. Se coloca una gota (~ 50 μL) en un portaobjetos y se observa al microscopio con el objetivo 10 x.

Ejemplo 7. Aplicación (resultados).

La formación de callos a partir de explantes (tallos) axénicos fueron conseguidos
5 utilizando la combinación del tratamiento número 6 del diseño experimental PB
(Tabla 1) que consistió en medio B5 modificado adicionado con ANA (0.5 mg/ml) y
zeatina (0.5 mg/mL), a un pH 5.5 y luz constante. Los callos fueron identificados a los
30 días de iniciar dicho tratamiento con un tamaño de 1 cm de diámetro. Estos callos
10 fueron friables de forma nodular, de color beige, sin agua alrededor y compacto en su
totalidad, así como no embriogénicos, como se muestra la Figura 1. La viabilidad de
los callos obtenidos fue determinada por el método de diacetato de fluoresceína
antes descrito y se observa en la Figura 2.

Ejemplo 8. Efecto de diferentes medios sobre la inducción de callos.

15 Los 12 tratamientos de cultivo utilizados en la presente invención se describen en la
Tabla 1, siendo que el tratamiento 6 fue el único que indujo la formación de callos de
color beige brillante. Los 11 tratamientos con distintos fitorreguladores que no
indujeron la callogénesis mostraron oxidación de los explantes y nulo crecimiento
20 durante el mes de observación.

Ejemplo 9. Efecto de diferentes pH sobre la inducción de callos.

Los medios fueron ajustados a tres diferentes pH como 5.0, 5.5 y 5.8. El tratamiento
25 6 resultó ser más efectivo, encontrando el pH idóneo de 5.5 para la inducción a
callogénesis. Por otro lado, los medios fueron enriquecidos con agua de coco, como
un antioxidante natural que además aporta factores de crecimiento y nutrientes, lo
cual favorece la obtención de células desdiferenciadas. Posterior a la callogénesis,
los medios de cultivo de mantenimiento y producción fueron en las mismas
30 condiciones para la generación de callos, solamente cambiando a un pH de 5.8.

Ejemplo 10. Efecto de las condiciones de cultivo en la inducción de callos.

Las condiciones de cultivo más importantes que favorecen la inducción de callos son
35 la temperatura y la luminosidad. Se estandarizó a 25 °C y se probaron dos
condiciones luz constante y oscuridad constante. El tratamiento 6, el único que indujo
a callogénesis fue a luz constante, siendo que los demás tratamientos presentaron
oxidación de los explantes y nulo crecimiento.

40

Ejemplo 11. Determinación de la viabilidad celular de los callos.

La viabilidad de las células desdiferenciadas fue determinada por un método de fluorescencia, con el diacetato de fluoresceína (FDA) y observado al microscopio electrónico invertido. Las células que reflejaron la luz ultravioleta con un verde brillante intenso fueron consideradas viables. El FDA es un sustrato de esterasa que penetra en las células y es hidrolizado por la actividad enzimática intracelular y de membrana. Tras la hidrólisis por esterasas intracelulares produce fluorescencia, que sirve como una sonda de viabilidad de integridad de membrana celular y actividad enzimática. Mediante esta técnica se lograron observar los callos viables, compactos en su totalidad, friables y con coloración verde brillante como se observa en la Figura 1.

15

BIBLIOGRAFÍA

- Davidse, G., Sousa, M., Knapp, S., Moran, C., Riba, R., Chiang, F., y Barrie, F. (1995). Flora Mesoamericana. Vol. 1. Psilotaceae a Salviniaceae. *Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.*
- 5
- Ma, X., Jiang, S., Zhu, D. (1998). Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae sensu lato occurring in China and their contribution to classification. *Biochem. Systemat. Ecol.*, 26, 723–728.
- 10
- Ma, X., Tan, C., Zhu D., Gang D., Xiao P. (2007). Huperzine A from *Huperzia* species-and ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113:15-34.
- Øllgaard, D. (1990). *Lycopodiaceae*. In: Kubitzki, K. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer Verlag, 1a. ed. pp. 404.
- 15
- Pereira, A. B. (2003). *Introdução ao estudo das pteridófitas*. 2. ed. Canoas: Ed. da ULBRA, 192p.
- 20
- Testo, W., Øllgaard B., Field A., Almeida T., Kessler M., Barrington D. (2018). Phylogenetic systematics, morphological evolution, and natural groups in neotropical *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae). *Mol. Phylog. Evol.* 125:1–13.
- Wagner, W., Beitel, J. (1992). Generic classification of modern north American *lycopodiaceae*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79:3: 676–686
- 25
- Hu, S., Zhang, L., Zheng, M., Mao, W., Du, J., Yu, J. (2017). Effective *Huperzia serrata* callus culture method. Solicitud de Patente China N° CN106613938 A.
- 30
- Zangara, A. (2003). The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75(3):675–686.
- Zhonghua, W., Xiaoxia, S. (2010). Rapid propagation method of *Huperzia serrata*. Solicitud de Patente China N° CN101658124 A.
- 35
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un método para la generación y propagación *in vitro* de callos de
5 *Phlegmariurus taxifolius* caracterizado por seguir los siguientes pasos:

10 a) Preparación del material vegetal a partir de explantes axénicos (desinfectados) obtenidos de los tallos de *P. taxifolius*, que se cortan de 1 cm x 0.5 cm de longitud y se transfieren a medios de cultivo con fitorreguladores.

15 b) Utilización del medio B5 modificando en las concentraciones de sus componentes: sacarosa 20 g/L, fitagel 4 g/L, polivinilpirrolidona (PVP) 1 g/L, nitrato de potasio (KNO₃) 1 g/L. Posterior a la esterilización de los medios de cultivo en autoclave, se adiciona un antioxidante natural (agua de coco 20 mL/L), esterilizado mediante filtración por membrana (0.2 µm).

20 c) Una vez adicionados los fitorreguladores, el medio se calibra a un pH de 5.5.

25 d) Los reguladores de crecimiento se usan en combinación de zeatina y ácido naftalenacético (ANA), en una proporción de 1:1 (v/v).

30 2. Un método de generación y propagación *in vitro* de *P. taxifolius* según la reivindicación 1, en el que ambas concentraciones de zeatina y ANA son de 0.5 mg/L.

35 3. Un método de generación y propagación rápida de *P. taxifolius* según la reivindicación 1, en el que las condiciones de cultivo se refieren a una temperatura de 25 °C, con luz constante.

40

35

40

RESUMEN

La presente invención aporta un método para la generación y propagación *in vitro* de callos de la planta *Phlegmariurus taxifolius*. Esta planta es un potencial candidato para la producción de huperzina A y alcaloides activos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de callos. En estudios fitoquímicos previos se identificó que esta planta es productora de este alcaloide. Éstos fueron realizados en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. La presente invención describe un método biotecnológico que ha permitido la generación y producción de callos de la especie *Phlegmariurus taxifolius* a partir de explantes axénicos. Esta invención muestra la formulación de un medio óptimo que permitió la callogénesis mediante el diseño experimental Plackett-Burman, utilizando el medio de cultivo vegetal en medio B5 modificado y enriquecido. Se seleccionaron los fitorreguladores adecuados para inducir callogénesis en *Phlegmariurus taxifolius* y su concentración óptima, así como el ajuste del pH idóneo y las condiciones de luminosidad, lo que permitió la generación de callos viables y friables.

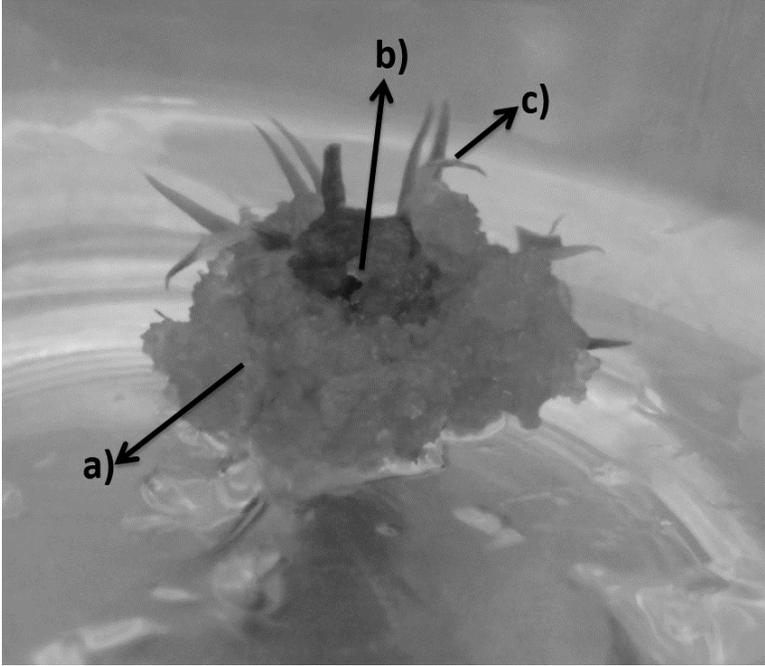


Fig. 1

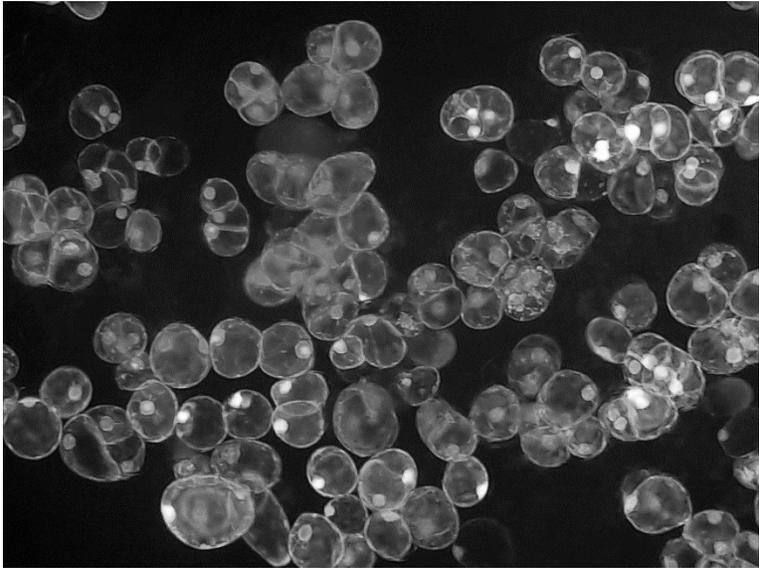


Fig. 2

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Talia Rodriguez Salgado

Título de la tesis: "ESTUDIO FITOQUÍMICO E INDUCCIÓN A CALLOGÉNESIS DE
Phlegmariurus taxifolius PARA LA PRODUCCIÓN DEL ALCALOIDE
ANTICOLINESTERÁSICO HUPERZINA A"

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia
 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César Rivera Leyva

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

3 de marzo de 2020

Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Talia Rodríguez Salgado

Título de la tesis:

"Estudio fitoquímico e inducción a callogénesis de *Phlegmariurus taxifolius* para
la producción del alcaloide anticolinesterásico huperzina A"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Crystal Columba Palomares

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

4 de Mayo 2020
Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Talia Rodríguez Salgado

Título de la tesis:

"Estudio fitoquímico e inducción a callogénesis de *Phlegmariurus taxifolius* para
la producción del alcaloide anticolinesterásico huperzina A"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Blanca Estela Duque Montaña

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

04-Marzo-2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Talia Rodríguez Salgado

Título de la tesis:

“Estudio fitoquímico e inducción a callogénesis de *Phlegmariurus taxifolius* para
la producción del alcaloide anticolinesterásico huperzina A”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

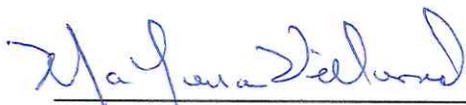
Miembro del jurado: Dra. María Luisa Villarreal Ortega

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

6 marzo 2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Talia Rodríguez Salgado

Título de la tesis:

“Estudio fitoquímico e inducción a callogénesis de *Phlegmariurus taxifolius* para
la producción del alcaloide anticolinesterásico huperzina A”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Nahim Salgado Medrano

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

02/03/20

Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Talia Rodríguez Salgado

Título de la tesis:

"Estudio fitoquímico e inducción a callogénesis de *Phlegmariurus taxifolius* para
la producción del alcaloide anticolinesterásico huperzina A"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Meneses Acosta

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

04/03/2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Talia Rodríguez Salgado

Título de la tesis:

“Estudio fitoquímico e inducción a callogénesis de *Phlegmariurus taxifolius* para
la producción del alcaloide anticolinesterásico huperzina A”

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia
 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Roberta Salinas Marín

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

03 mar 2020

Fecha