

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO
DICLOROMETANO-METANOL DE *Lopezia racemosa* EN UN MODELO
MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

BIOL. WILVER MONTES DORANTES

DIRIGIDO POR:

**TUTOR: DRA. MA. DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE
CO-TUTOR: DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO**

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2019

Agradecimientos

A mis padres Delfino Montes Salazar y Virginia Dorantes Abraham que me han apoyado a lo largo de mi vida y que han estado para mí en todo momento, sin importar a donde me dirija o hacia donde vaya, ellos siempre van a estar conmigo y siempre van a estar para mí, a mis hermanos, Miriam, Griselda y Emanuel, que son mi apoyo, les agradezco infinitamente, cada paso que doy ellos están conmigo, cada meta que cumpla también la cumplen conmigo y a toda mi familia que me llevo a todas partes.

Agradezco también a toda mi familia, a mis abuelitos, tíos, primos, y a cada uno de los nuevos integrantes de mi familia por estar siempre a mi lado apoyándome.

A María Fernanda Gaitán Rodríguez, que es una mujer maravillosa y a quien admiro, que me acompañó en esta etapa de mi vida de la mano y ha estado conmigo, le doy las gracias por su paciencia, cariño y el amor que me demuestra día con día, así como todas las cosas lindas y maravillosas que hemos compartido en este tiempo, por eso y muchas cosas que compartiremos en el futuro, te amo. Agradezco también a la familia Gaitán (Raul Gaitán, Carmen Rodríguez, Esperanza, Airam y Daniel) y a toda la gente cercana a ellos, por todas sus atenciones y el apoyo que me brindaron al final de este trabajo.

Mi más amplio reconocimiento a las siguientes personas que me brindaron su apoyo.

A mis amigos (Miguel, Javier, Karina, Diana, Carolina, y Sinead) y a la familia Menéndez (Miguel Menéndez, Bertha Acuña y Michelle), que me acompañaron durante esta travesía, les agradezco profundamente.

A mis compañeros de generación: Héctor, Juan C., Ricardo, Giovanni, Enrique, Arturo, Ely, Noreli, y Dulce, aprendí y comprendí muchas cosas.

Quiero agradecer a mi comité, empezando por la directora de tesis la Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte, y cotutora la Dra. Irene de la Concepción Perea Arango, ya que estuvieron al pendiente del trabajo para que se llevara a cabo correctamente, así como las observaciones, recomendaciones en el escrito y el área experimental de este trabajo y por la paciencia ante el alumno en formación. Así como al Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa y Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz que aportaron su conocimiento, recomendaciones, observaciones y la revisión continua en cada seminario, para la

realización correctamente este proyecto, muchas gracias. A la Dra. Susana Valencia Díaz que forma parte del comité muchas gracias.

Quiero agradecer a la Dra. Juana Villeda Hernández por haberme aceptado en las estancias periódicas en el laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y por todo el apoyo en la parte histoquímica de este trabajo.

También quiero agradecer a la Mtra. Carolina Abarca Camacho y José Manuel Castro por seguir este proyecto de cerca, gracias por la ayuda en las técnicas de laboratorio, los consejos y comentarios aportados en el desarrollo de este trabajo.

A los futuros biólogos, que realizaron las estancias de la FCB y me brindaron su apoyo en la realización de este trabajo: Ramsés y Viridiana gracias chicos.

También quiero dejar constancia de mi agradecimiento para toda la gente que estuvo involucrada en este trabajo y aportó para la realización de este proyecto, mi más sincera gratitud.

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Susana Valencia Díaz

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Antecedentes	6
3.1 Enfermedades neurodegenerativas	6
3.2 Neuroinflamación	6
3.3 Estudio de las enfermedades neurodegenerativas.....	7
3.4 Tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas (inflamatorias)	8
3.5 Alternativas de tratamiento natural contra enfermedades neurodegenerativas	9
3.6 <i>Lopezia racemosa</i>	10
3.6.1 Estudios fitoquímicos de <i>L. racemosa</i>	11
4. Justificación.....	13
5. Hipótesis.....	13
6. Objetivo general	13
7. Objetivos particulares.....	13
8. Estrategia experimental.....	14
9. Metodología	15
9.1 Modelo experimental	15
9.2 Establecimiento del modelo murino de neuroinflamación inducida por LPS ..	15
9.3 Prueba para evaluar la memoria espacial	16
9.3.1 Condiciones del laberinto de agua de Morris (LAM)	16
9.3.2 Ensayo del laberinto de agua de Morris (Fase de adquisición).....	17
9.3.3 Ensayo del laberinto de agua de Morris (Fase de retención).....	17
9.4 Histoquímica	18
9.5 Evaluación de los extractos de <i>Lopezia racemosa</i>	19
9.6 Análisis estadístico	20
10. Resultados	21
10.1 Evaluación de la memoria espacial.....	21
10.1.1.1 Influencia del horario en la memoria espacial	21
10.1.1.2 Influencia de la edad de los ratones en la memoria espacial	22
10.1.2 Efecto del LPS sobre la prueba conductual del LAM.....	24
10.1.3 Efecto del LPS a nivel histológico.....	25
10.1.4 Análisis estadístico de la región CA1 y CA3 del hipocampo de ratón	29

10.1.4.1 Evaluación del ancho de la región CA1 del hipocampo en ratones.....	29
10.1.4.2 Evaluación de células picnóticas en la región CA3 del hipocampo	30
10.1.4.3 Evaluación inmunohistoquímica en la región CA1 del hipocampo de ratón.....	31
10.2 Evaluación inmunohistoquímica del extracto diclorometano-metanol antiinflamatorio de <i>L. racemosa</i> en la región CA1 del hipocampo de ratón	32
11. Discusión.....	34
12. Conclusiones	38
13. Perspectivas	38
14. Anexos.....	39
15. Literatura citada.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lopezia racemosa</i> Cav.....	11
Figura 2. A: Figura 2.A: 6-O-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosilcampesterol y B: 6-O- palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-sitosterol.	12
Figura 3. (23R)-2α,3β,23,28-tetrahidroxi-14,15-dehidrocampesterol.	12
Figura 4. LAM: Fase de adquisición, t de Student, p<0.05, n=5, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). m: grupo de la mañana y t: grupo de la tarde.	21
Figura 5. LAM: Fase de retención, t de Student, p<0.05, n=5, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). m: grupo de la mañana y t: grupo de la tarde.	22
Figura 6. LAM: Fase de adquisición, t de Student, p<0.05, n=5, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Ratones jóvenes (J) y Ratones adultos (A).....	23
Figura 7. LAM: Fase de retención, t de Student p<0.05, n=5, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Ratones jóvenes (J) y Ratones adultos (A).....	23
Figura 8. LAM: Fase de adquisición, ANOVA p<0.05, n=3, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Grupo: Normal, vehículo (solución salina 0.9%), crónico (250μg/kg) y agudo (5mg/kg).....	24
Figura 9. LAM: Fase de retención, ANOVA p<0.05, n=3, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Grupo: Normal, vehículo (solución salina 0.9%), crónico (250μg/kg) y agudo (5mg/kg).....	25
Figura 10. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, CA3 y TNFα en CA1 de ratón.	26
Figura 11. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, CA3 y TNFα en CA1 de ratón.	27

Figura 12. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, y CA3 de ratón.	28
Figura 13. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, y CA3 de ratón.	29
Figura 14. Ancho de la región CA1 (μm) del hipocampo. ANOVA $p < 0.05$, $n = 3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Dosis de $250\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS. Normal, Control (solución salina 0.9%), 15 horas, Días 1, 3, 7 y 14.	30
Figura 15. Número de células picnóticas en la región CA3 del hipocampo. ANOVA $p < 0.05$ y Tukey, $n = 3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Dosis de ($250\mu\text{g}/\text{kg}$) de LPS. Grupo: 15 horas, Días 1, 3, 7 y 14.....	31
Figura 16. Número de células reactivas para TNF- α en la región CA1 del hipocampo ANOVA $p < 0.05$, Dunnett's, $n = 3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Dosis de ($250\mu\text{g}/\text{kg}$) de LPS Grupo: Control (solución salina 0.9%), Días 3, 7, y 14.	31
Figura 17. Inmunohistoquímica para TNF- α en CA1 de ratón, dosis de $250\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS a diferentes tiempos: A) Control (S.S. 0.9%), B) Día 3, C) Día 7 y D) Día 14.....	32
Figura 18. Número de células reactivas para TNF- α en la región CA1 del hipocampo. ANOVA $p < 0.05$, Dunnett's, $n = 3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Grupos: Control negativo (solución salina 0.9%), control positivo LPS ($250\mu\text{g}/\text{kg}$), $12.5\text{ mg}/\text{kg}$, $25\text{ mg}/\text{kg}$ y $50\text{ mg}/\text{kg}$	33
Figura 19. Inmunohistoquímica de TNF- α en CA1 del hipocampo de ratón. Grupos: A. Control negativo (solución salina 0.9%), B control positivo LPS $250\mu\text{g}/\text{kg}$, C: $12.5\text{ mg}/\text{kg}$, D: $25\text{ mg}/\text{kg}$ y E: $50\text{ mg}/\text{kg}$ del extracto diclorometano-metanol de <i>L. racemosa</i>	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inyección vía i.p. con el LPS de <i>E. coli</i> (O111:B4).....	15
Tabla 2. Tratamientos.	19

LÍNEA DE TIEMPO

Línea 1. Implementación del modelo de inflamación y laberinto de agua de Morris..	18
Línea 2. Evaluación del extracto diclorometano-metanol de <i>L. racemosa</i>	19

1. Resumen

Las enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis múltiple, entre otras, son unos de los principales problemas neurodegenerativos. Una de las características principales que involucra estos padecimientos es la inflamación, producto de la secreción de citocinas como: IL-1, IL-6 y TNF- α , mediadas por la glía. El factor limitante en el estudio de estas enfermedades es un modelo que reproduzca fielmente las características neurodegenerativas, debido a que el estudio en pacientes es muy difícil. Para la enfermedad de Alzheimer, así como en estudios de neuroinflamación se han empleado modelos animales (principalmente en roedores) y modelos transgénicos e inducidos (inyección intracraneal del péptido β -amiloide o de lipopolisacáridos LPS) con el objetivo de generar los rasgos característicos a nivel cognitivo e histológico (inflamación y daño celular) de estas enfermedades, lo que permite mejorar la comprensión y la búsqueda de estrategias que ayuden a mejorar los síntomas o detener su progresividad. Actualmente no existe cura para las enfermedades neurodegenerativas, solamente se cuenta con medicamentos que disminuyen los síntomas con efectos secundarios no deseados. En este sentido los extractos derivados de plantas pueden representar una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos. Estudios llevados a cabo con ratones como modelo de estudio han reportado la actividad de extractos de plantas con actividad antiinflamatoria, observando una disminución de daño a nivel histológico y de memoria. En el presente trabajo se evaluó el efecto antiinflamatorio de *Lopezia racemosa*, planta utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades inflamatorias. En la primera etapa de este trabajo se implementó el modelo inflamatorio a través de la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS), y se estudió la influencia en la memoria espacial de los ratones. Sin embargo no se presentó un efecto en la memoria espacial a través del ensayo Laberinto de Agua de Morris (LAM), posiblemente al poco tiempo de exposición de esta endotoxina, ya que el daño se ve reflejado a nivel celular en la región CA1 y CA3 del hipocampo en el tercer día después de su aplicación, teniendo como medida de respuesta: células picnóticas y células reactivas para la citocina TNF- α . En la segunda etapa se llevó a cabo la evaluación antiinflamatoria del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*, donde se observó una disminución de las células reactivas para TNF- α utilizando una dosis de 50 mg/kg del extracto.

2. Introducción

Actualmente las enfermedades neurodegenerativas son un problema de salud. Se ha observado que estas enfermedades presentan características clínicas en común, como su inicio insidioso, así como un curso progresivo sin tratamiento eficaz (Rodríguez-Agudelo *et al.*, 2010).

La clasificación de las enfermedades degenerativas se establece en función de las manifestaciones clínicas con las que se presentan, pudiendo entonces distinguirse aquellas que lo hacen fundamentalmente con un síndrome demencial, la enfermedad de Alzheimer (EA) el más claro exponente; se manifiestan fundamentalmente con trastornos del movimiento y la postura como es el caso de la enfermedad de Parkinson; aquellas en las que la clínica fundamental es la debilidad y atrofia muscular, como es el caso de la esclerosis lateral amiotrófica; y con presentaciones diversas (De Pipaón y Larumbe., 2001).

La EA se caracteriza por la pérdida de la memoria y tan sólo en el 2008 se reportaron 24 millones de casos de demencia Debido principalmente a esta enfermedad, para el 2015 esta cifra aumentó hasta 36 millones y se estiman hasta 66 millones de casos para el 2030 (Álvarez *et al.*, 2008 y Sabogal-Guáqueta *et al.*, 2015).

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer. Afecta aproximadamente al 1-2% de los adultos mayores a 60 años; se estima que 5-6 millones de personas la presentan alrededor del mundo (Sandoval-Avila *et al.*, 2016).

El estudio de los padecimientos neurodegenerativos ha demostrado que el mecanismo de neuroinflamación tiene un papel principal como en la enfermedad de Alzheimer. Actualmente se siguen buscando nuevas estrategias para el tratamiento de estas enfermedades así como la propuesta de nuevas dianas terapéuticas (Kim *et al.*, 2012). La asociación de la inflamación con la EA se planteó a finales de los ochenta y desde entonces se han identificado mediadores de inflamación como la Interleucina-1 Beta (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α), que están involucradas en este proceso (Reynaldo *et al.*, 2008). Por lo tanto es importante considerar la neuroinflamación como una de las características principales en las enfermedades neurodegenerativas.

3. Antecedentes

3.1 Enfermedades neurodegenerativas

La neurodegeneración se caracteriza por el deterioro progresivo de las células nerviosas, se presentan mayormente en las personas de edad avanzada (Álvarez *et al.*, 2008 y Sabogal-Guáqueta *et al.*, 2015).

Estas enfermedades se presentan por una disminución en el número de determinadas poblaciones neuronales: en la enfermedad de Alzheimer se ha observado una disminución de neuronas colinérgicas principalmente en el hipocampo y la amígdala, en la enfermedad de Parkinson el daño se presenta en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales; finalmente, en la esclerosis lateral amiotrófica existe una reducción en la población de motoneuronas (Segura *et al.*, 2003).

3.2 Neuroinflamación

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo y se produce ante un estímulo perjudicial, originado por factores externos o internos, como lesiones por agentes físicos, químicos o inmunológicos. Durante la respuesta inflamatoria se desata una compleja cascada de eventos celulares: activación de enzimas, liberación de mediadores químicos, extracción de fluidos, migración celular, rotura y reparación celular.

La inflamación es una característica de algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Segura *et al.*, 2003). La neuroinflamación es un mecanismo de protección mediada por la glía (astrocitos y microglía) en la que se liberan y aumentan los diferentes niveles de citocinas proinflamatorias por ejemplo TNF- α y IL-1 β , así como la ciclo-oxigenasa (COX-2); sin embargo, el exceso de estos mediadores vuelve tóxico el medio, lo que ocasiona una sobreactivación de la microglía, que a su vez conduce a una muerte neuronal en algunas zonas del cerebro (Kim *et al.*, 2012 y Nava y Gevorkian., 2016), provocando así la aparición de las enfermedades neurodegenerativas. Existe evidencia epidemiológica y modelos experimentales que muestran que las condiciones proinflamatorias promueven el desarrollo de EA. No sería la acumulación de A β , sino la respuesta inflamatoria al A β , la responsable del daño neuronal en la EA (Bernhardi, R. 2007).

Se ha observado que la inflamación cerebral se puede originar a través de agentes tóxicos como el LPS, un componente de la pared de las bacterias Gram negativas que involucra el sistema inmunitario de los mamíferos. Es reconocido a través del patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), inmediatamente a través de monocitos y linfocitos. Una vez

que las moléculas de LPS logran cruzar la barrera hematoencefálica, se unen al agrupamiento de diferenciación CD14 que está anclado a GPI en la superficie celular. El CD14 unido a LPS interactúa con TLR4 y su proteína asociada MD2. La microglía inicia una cascada de transducción de señales que conducen a la rápida transcripción y liberación de citocinas proinflamatorias dependientes de NFκB, lo que induce la liberación de IL-1β y TNF-α (Guha y Mackman., 2001, Spulber *et al.*, 2012, O'Callaghan *et al.*, 2015).

3.3 Estudio de las enfermedades neurodegenerativas

La investigación en pacientes presenta la limitación más importante, para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, debido a esto se han desarrollado modelos experimentales en animales que tratan de explicar las bases moleculares, celulares, patológicas y conductuales en humanos (Navarrete *et al.*, 2008 y Coronas-Sámano *et al.*, 2011).

Los trastornos cognitivos se han estudiado mayormente en primates y roedores, cuyos procesos neuronales son similares a la función cognitiva humana (Navarrete *et al.*, 2008). Los roedores, en especial la rata y el ratón, son los animales más utilizados en los laboratorios. Esto gracias a que tienen un ciclo reproductivo corto (21 días de gestación) y una alta tasa de reproducción; así mismo, y debido a su reducido tamaño son fáciles de manejar, permitiendo su manipulación y conservación (Sarasa., 2006).

Los modelos tienen como objetivo fundamental tratar de replicar los síntomas y lesiones cerebrales responsables de las enfermedades neurodegenerativas (Coronas-Sámano *et al.*, 2011). Sin embargo, las modificaciones genéticas aún tienen algunos obstáculos por resolver: a) la gran variabilidad entre un individuo y otro, b) la falta de fenotipo de muchos transgenes y c) su elevado costo de producción y mantenimiento (Sarasa., 2006).

Actualmente se ha empleado el modelo inflamatorio a partir de la inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratones, que generan un cuadro sistémico inflamatorio después de su administración. Se ha reportado la administración intracerebral o vía intraperitoneal (i.p.) sistémica de LPS, con dosificaciones crónicas (250 µg/kg) y agudas (5mg/kg) que puede incrementar la respuesta inflamatoria mediada por la microglía a través de los mediadores proinflamatorios como TNF-α, IL-1β y la GFAP (proteína de la glía) (Bernhardi., 2005).

Así mismo se ha demostrado que la neuroinflamación deteriora la plasticidad sináptica del hipocampo, aumentando la muerte neuronal interrumpiendo el aprendizaje y la memoria

dependiente del hipocampo, fenómenos que se abordan en ratones después de la administración de LPS. Con base a esto, se han detectado: un aumento en la apoptosis neuronal, la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, la reducción de la expresión del factor neurotrófico del derivado del cerebro, así como la reducción del comportamiento social, actividad locomotora y problemas que impliquen tareas de aprendizaje y memoria (Olajide *et al.*, 2013 y Nava y Gevorkian., 2016).

Los modelos ofrecen la oportunidad de estudiar directamente la relación entre los cambios conductuales de la enfermedad, así como aspectos histopatológicos del cerebro. El estudio de los cambios conductuales e histológicos son importantes para avanzar en la comprensión de la evolución de las enfermedades y proponer tratamientos que disminuyan los síntomas (Allemang-Grand *et al.*, 2015).

3.4 Tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas (inflamatorias)

Actualmente la detección de los problemas neurodegenerativos no es del 100% ya que hasta el momento no existen marcadores para detectar estos padecimientos. Se estima que el tiempo que tarda el diagnóstico, la enfermedad ya ha progresado varios años (Herrera-Rivero *et al.*, 2010). El avance que se ha logrado en el tratamiento hasta el momento se debe a los medicamentos que controlan los síntomas; sin embargo, éstos no detienen la progresividad (Onos *et al.*, 2016).

Para el tratamiento de la EA los medicamentos se basan en: inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (Donepezil, Rivastigmina y Galantamina) (Herrera-Rivero *et al.*, 2010); en el tramiposate y otros medicamentos son utilizados en la prevención y disminución de la agregación del péptido βA_{42} (Kumar *et al.*, 2014); el astemizol y lanzoprazol muestran afinidad con la proteína tau, por lo tanto, reducen la interacción de la proteína tau consigo misma e inhibe la formación de ovillos neurofibrilares (Kumar *et al.*, 2014). Otra alternativa para tratar de controlar la enfermedad es el uso de inhibidores de la enzima β -secretasa (GRL-8234), encargada de escindir a la proteína precursora amiloide (PPA) y así detener la producción del péptido βA , que origina la formación de placas seniles (Sarasa, 2006). La mayoría de los ensayos clínicos destinados a disminuir este péptido no han sido exitosos (Godýn *et al.*, 2016). Además, con los medicamentos actuales para la EA se han observado algunos efectos secundarios como diarrea, náuseas, insomnio, fatiga y pérdida de apetito (Herrera-Rivero *et al.*, 2010).

Para la enfermedad de Parkinson se ha utilizado la administración de levodopa de forma oral o intravenosa, reduciendo de forma significativa los síntomas de la enfermedad. Sin

embargo, se ha observado un importante porcentaje de pacientes tratados desarrollan complicaciones motoras al cabo de varios años, también se han utilizado los agonistas dopaminérgicos como los derivados ergóticos y no ergóticos; cabe mencionar que con estos medicamentos siguen presentando efectos secundarios no deseados (Luquin *et al.*, 2012 y Cánovas *et al.*, 2014).

Un obstáculo importante para el desarrollo de terapias surge en la dificultad de replicar totalmente los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas observadas en los pacientes, por lo tanto, en los modelos de estudio se siguen buscando herramientas de diagnóstico, así como estrategias terapéuticas para detener la progresividad de estas enfermedades (Godón, *et al.*, 2016).

3.5 Alternativas de tratamiento natural contra enfermedades neurodegenerativas

Actualmente se estima que el 80% de la población mundial utiliza las plantas como principal remedio medicinal, según señala la OMS. Sin olvidar que el 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o se han sintetizado a partir de sustancias encontradas en la investigación fitoquímica (Beyra *et al.*, 2004 y Barrera-Catalán *et al.*, 2015).

Los extractos del fruto *Lycii fructus* (Lf) presentan efectos neuroprotectores reportados en un estudio llevado a cabo con esta planta en ratones transgénicos (3xTg-AD) con EA. Se evaluó un ejercicio de aprendizaje espacial y de memoria (laberinto de agua de Morris), y otros parámetros que incluyen el aumento de BDNF, TrkB, y disminución del depósito de β A en el hipocampo; se observó que el tratamiento con Lf atenúa la deficiencia de aprendizaje y memoria, reduce la carga de β A y aumenta la neurogénesis mediante la expresión de BDNF y TrkB en los ratones. Por lo tanto Lf tienen un uso potencial para el tratamiento de esta enfermedad (Ye *et al.* 2015).

Por otro lado, se ha observado que criptolepina, un alcaloide de *Cryptolepis sanguinoleta*, especie que se encuentra al Este de África, produce un efecto antiinflamatorio, evaluado en modelos *in vitro* e *in vivo* (Olajide *et al.*, 2013). Así mismo se ha reportado que *Teloxys ambrosioides* presentó efectos positivos para la memoria. (Barrera-Catalán *et al.*, 2015).

Los flavonoides, como la quercetina tiene propiedades neuroprotectoras para al cerebro. Además de promover la memoria y el aprendizaje pueden ser utilizados para contrarrestar los efectos de la EA (Sabogal-Guáqueta *et al.*, 2015).

Otra de las alternativas es el ginseng, se ha demostrado en diversos trabajos, sus efectos favorables en trastornos del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas

tales como la EA. Los ginsenósidos (GRg1 y GRb1) son los principales agentes activos que inhiben la neuroinflamación y acumulación de β A; la GRg1 protege a las neuronas de los radicales libres e inhibe la apoptosis neuronal, mientras la GRb1 protege las neuronas del hipocampo de la neuroinflamación y la peroxidación (Zhou *et al.*, 2014 y Li *et al.*, 2015).

Lagerstroemia ovalifolia se ha utilizado en la medicina tradicional debido a las propiedades antiinflamatorias que posee. Su extracto metanólico disminuyó la producción de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), IL -6, IL-1 β y TNF- α en células RAW 264.7 (macrófagos murinos) estimulados por LPS a una concentración de 0.5 μ g/mL (Park *et al.*, 2016).

Se empleó el extracto metanólico de *Citrus wilsonii* en el modelo de macrófagos RAW 264.7 y células BMDC primarios de ratón para llevar a cabo la detección de mediadores inflamatorios y citocinas. Se trataron a diferentes concentraciones del extracto (0, 62.5, 125, 250, 500, y 1000 μ g/mL) y LPS (1 μ g/mL). La mejor concentración del extracto fue 250 μ g/mL debido a que disminuyó la expresión de PEG₂, COX-2, IL-1 β e IL-6. Posteriormente se comprobó la eficacia de este extracto utilizando una concentración de LPS de 100 ng/mL en células dendríticas de médula ósea (BMDC), observando que 1 μ g/mL de *Citrus wilsonii* disminuyó notablemente la expresión de COX-2, IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Así mismo el perfil analítico demostró la presencia de 22 tipos de metabolitos, siendo que los flavonoides fueron los más abundantes en los extractos metanólicos. Por lo tanto, los resultados determinaron que *Citrus wilsonii* presentó actividad antiinflamatoria significativa en la inflamación desencadenada por LPS (Chang *et al.*, 2017).

En lo referente a nuestra planta de estudio, se ha observado que el extracto de *Lopezia racemosa* presenta un efecto antiinflamatorio evaluado en un modelo de edema de ratón (Salinas *et al.*, 2014).

3.6 Lopezia racemosa

Lopezia racemosa es una planta de la familia Onagraceae (Tabla 1), que pertenece al phylum Magnoliophyta y se encuentra distribuida en todo el mundo, pero está mejor representada en el norte y sur de América. Se estima que en México existen 17 géneros y 214 especies pertenecientes a esta familia, se han utilizado de forma ornamental, medicinal y también se emplean en la industria de la perfumería. Morelos es un estado con mayor endemismo en su flora, con 8 géneros y 26 especies pertenecientes a esta familia (Onagraceae). *L. racemosa* se encuentra registrada en 13 de los 33 municipios del estado (figura 1) (Miguel-Vázquez y Cerros-Tlatilpa, 2013).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Lopezia racemosa*

Taxonomía

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Onagraceae

Género: *Lopezia*

Epíteto específico: *racemosa*

Nombre científico: *Lopezia racemosa*

Autor del nombre: Cav.



Figura 1. *Lopezia racemosa* Cav.

Lopezia es un género considerado invasivo, debido a la facilidad que tiene para colonizar diferentes tipos de hábitat en el país (Miguel-Vázquez y Cerros-Tlatilpa, 2013). *L. racemosa* es una planta anual o perenne, cubierta con pelos rígidos algunos ensanchados en la base; tallos erectos que se arraigan en los nudos, florece de noviembre a abril, crece en bosques de pino-encino, de oyamel, mesófilo de montaña, pastizales, matorrales, frecuentemente como maleza a la orilla de los caminos, campos de cultivo y otros sitios sujetos a perturbación (Moreno-Anzures *et al.*, 2017). Esta planta, conocida comúnmente como hierba punzón, es utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades inflamatorias (Salinas *et al.*, 2014).

3.6.1 Estudios fitoquímicos de *L. racemosa*

En un primer reporte llevado a cabo con *L. racemosa* se evaluaron extractos de la parte aérea de la planta, los cuales mostraron actividad antiinflamatoria. La fracción hexánica mostró la mayor actividad antiinflamatoria, la cual fue determinada por la medición de citocinas inflamatorias (interleucina 6) secretadas por macrófagos humanos (Cruz-Paredes *et al.*, 2013).

Recientemente se demostró que los extractos fraccionados de esta planta poseen actividad antiinflamatoria. Se llevaron a cabo bioensayos con extractos orgánicos (hexano, diclorometano y metanol) de *Lopezia racemosa*, observando el mayor efecto en el extracto diclorometano en el modelo de edema de oreja de ratón, con una respuesta antiinflamatoria

de 58.3%. Posteriormente se realizó un fraccionamiento por cromatografía en columna, utilizando diclorometano-acetona como eluyente, obteniendo seis fracciones, demostrando que la fracción LR50B presentó una inhibición del 86.2% de la inflamación, se atribuyó a la mezcla de 6-O-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosilcampesterol (figura 2A) y 6-O-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-sitosterol (figura 2B) (Salinas *et al.*, 2014).

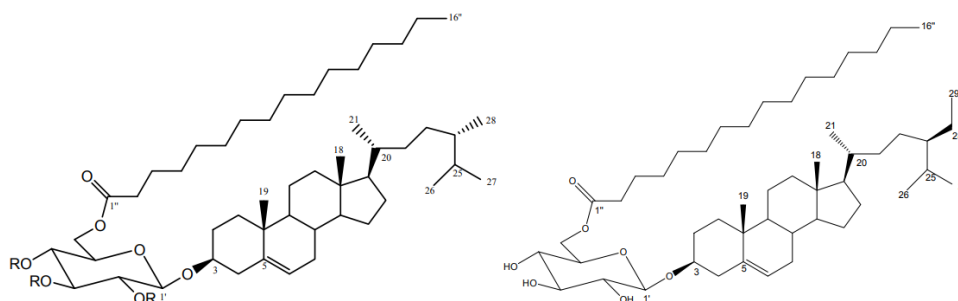


Figura 2. A: Figura 2.A: 6-O-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosilcampesterol y **B:** 6-O-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-sitosterol.

En el 2017 Moreno-Anzures y colaboradores, a partir de una línea de raíces pilosas de *L. racemosa*, prepararon un extracto con diclorometano-metanol (1:1), fue evaluado en un modelo de edema de oreja de ratón, observando una inhibición del 50.5%. Posteriormente se realizó una purificación por cromatografía en columna, se evaluó una fracción y se observó una inhibición de 85.6%, atribuyendo esta actividad antiinflamatoria a un derivado de campesterol; (23R)-2α,3β,23,28-tetrahidroxi-14,15-dehidrocampesterol (Figura 3).

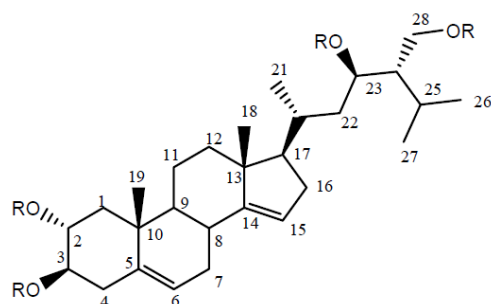


Figura 3. (23R)-2α,3β,23,28-tetrahidroxi-14,15-dehidrocampesterol.

Por otra parte, plántulas regeneradas vía organogénesis directa e indirecta fueron evaluadas químicamente a partir de los cuales se determinó la presencia del 6-O-caproil-3-

β -D-glucósido de β -sitosterol y el glucósido de β -sitosterol en plantas regeneradas vía organogénesis indirecta (Moreno-Anzures *et al.*, 2017).

4. Justificación

Se ha sugerido que la inflamación sistémica puede ocasionar la aparición y progresión de enfermedades cerebrales crónicas incluyendo la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Hey-Kyeong., 2010). Se ha reportado que estos padecimientos son la principal causa de demencia, factor que más contribuye a la discapacidad y dependencia en las personas adultas mayores. La neuroinflamación presenta un efecto adverso en algunas enfermedades neurodegenerativas debido a la activación de la microglía y una relación consecuente con los efectos proinflamatorios mediados por IL-1 β , TNF- α y especies reactivas de oxígeno. Es por ello que, una reducción de los mediadores proinflamatorios de la microglía podría atenuar la severidad de estos desórdenes (Kim *et al.*, 2012). Actualmente no existe cura para estas enfermedades; lo que se ha logrado hasta el momento son medicamentos que disminuyen los síntomas sin detener la progresividad de las enfermedades. La búsqueda de nuevas alternativas naturales que presenten actividad antiinflamatoria, disminuyan los síntomas y efectos no deseados provocados por los medicamentos es de vital importancia.

5. Hipótesis

El extracto diclorometano-metanol de *Lopezia racemosa* con actividad antiinflamatoria inhibirá la respuesta mediada por la microglía, en un modelo de inflamación.

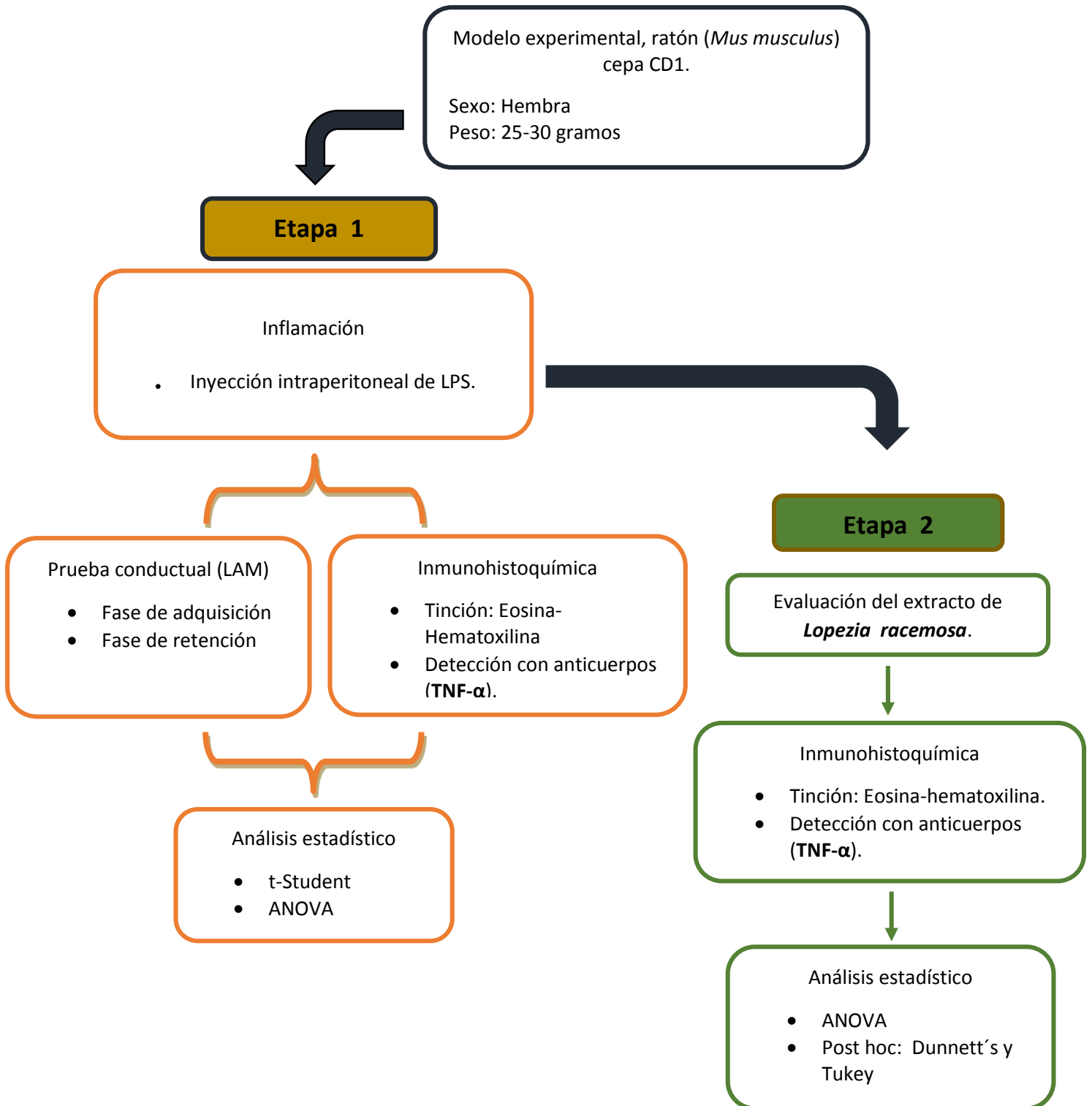
6. Objetivo general

Evaluar el efecto neuroinflamatorio del extracto de *Lopezia racemosa* en un modelo murino de inflamación.

7. Objetivos particulares

- Determinar el efecto inflamatorio en la pérdida de memoria espacial.
- Identificar el daño en la región CA1 y CA3 del hipocampo de ratón.
- Analizar la actividad antiinflamatorio del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa* en el hipocampo de ratón.

8. Estrategia experimental



9. Metodología

El presente trabajo se dividió en dos etapas, la primera consistió en la implementación del modelo murino inflamatorio inducido a través de una inyección intraperitoneal del LPS, en la segunda etapa se evaluó el extracto con actividad antiinflamatoria de *L. racemosa*.

9.1 Modelo experimental

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizaron ratones hembras de la cepa CD1 (*Mus musculus*) como modelo experimental, con un peso de entre 25 y 30 gramos (edad adulta) proporcionados por el bioterio del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM).

9.2 Establecimiento del modelo murino de neuroinflamación inducida por LPS

Se utilizó el lipopolisacárido LPS (O111:B4) para ocasionar el daño (inflamación) en los cerebros de los ratones. El lipopolisacárido se disolvió en solución salina al 0.9% y se inyectó vía intraperitoneal (i.p.) a los ratones de la cepa CD1 durante una fase crónica y aguda.

Para la evaluar la memoria espacial en la primera etapa se utilizaron 12 ratones divididos en 4 grupos de 3 organismos como se muestra en la Tabla 2, para observar el déficit de la memoria espacial se utilizaron dos grupos: agudo y crónico como se mencionan a continuación.

El LPS fue evaluado en dos diferentes concentraciones: grupo A, se aplicó una sola dosis de 5 mg/kg de LPS (agudo); y B, se administró una dosis de 250 µg/kg de manera constante durante siete días (crónico); los grupos C y D se utilizaron como controles negativos, en el grupo C se inyectó únicamente el vehículo (solución salina al 0.9%) el grupo D no recibió ningún tipo de tratamiento (Qin *et al.*, 2007, Woong *et al.*, 2008 y Qun *et al.*, 2014).

Tabla 1. Inyección vía i.p. con el LPS de *E. coli* (O111:B4).

Grupo	Lesión
A	5 mg/kg LPS
B	250 µg/kg LPS
C	Solución salina 0.9% (vehículo)
D	Sin lesión

El efecto inflamatorio producido por el LPS se evaluó siete días después en los grupos A y B para corroborar el déficit de memoria espacial en los ratones, se llevó a cabo la prueba del Laberinto de Agua de Morris (LAM).

Como parte de la implementación del LAM se determinó la influencia del horario y la edad en los ratones. Para el parámetro del horario se utilizaron dos diferentes horarios: mañana 7 a.m. y tarde 5 p.m.; para el parámetro de la edad, se utilizaron dos grupos: de 3 meses de nacidos y otro de 6 meses, con el propósito de eliminar algún efecto, producto de estos parámetros mencionados.

9.3 Prueba para evaluar la memoria espacial

Para medir la memoria espacial, los ratones fueron sometidos a la prueba del LAM. El laberinto de agua fue diseñado en 1981 por Richard G. Morris, para estudiar y evaluar la memoria espacial en roedores de laboratorio. Esta memoria se relaciona con la capacidad de adquirir y retener asociaciones que se encuentran en el entorno. Este ensayo se ha convertido en uno de los más frecuentes en neurociencia del comportamiento. El LAM consiste en una piscina circular llena de agua, en la que se sitúa una plataforma que debe ser localizada por el organismo de estudio, que a su vez se divide en dos fases: una de adquisición y otra de retención (Vicens *et al.*, 2003 y Navarrete *et al.*, 2008).

9.3.1 Condiciones del laberinto de agua de Morris (LAM)

El LAM es una piscina circular llena de agua a una temperatura que puede oscilar entre 18 y 27°C, en la que se sumerge una plataforma que debe ser localizada por el organismo de estudio (*Mus musculus*).

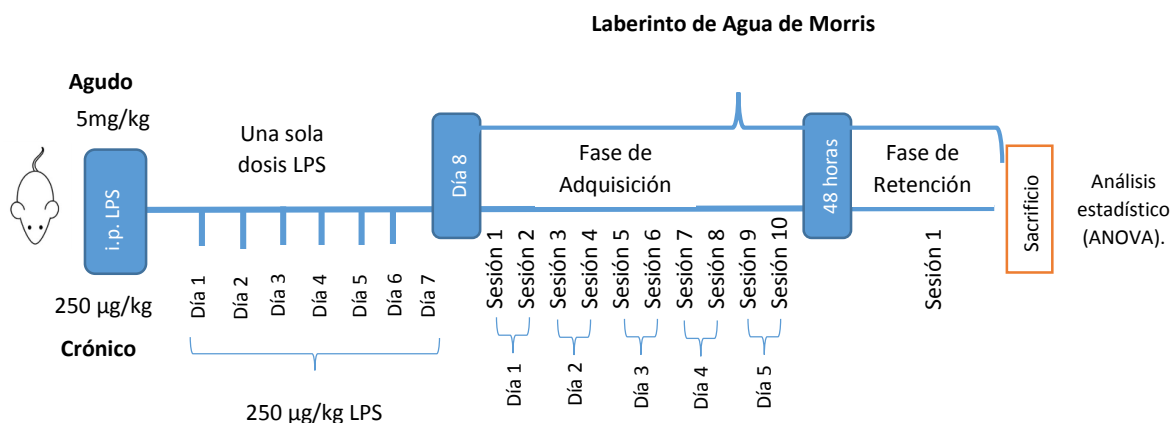
- El diámetro de la piscina es de 78 cm con una altura de 36 cm y un punto de referencia (pelota roja).
- Para la tarea de escape (sesión de adquisición), se utilizó una plataforma de 10 cm de diámetro, sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua.
- La piscina se dividió en 4 cuadrantes iguales: derecho inferior y superior (DI y DS), e izquierdo inferior y superior (II y IS).

9.3.2 Ensayo del laberinto de agua de Morris (Fase de adquisición)

- En esta fase, se introduce al organismo con el hocico apuntando hacia las paredes de la piscina y se deja nadar hasta encontrar la plataforma escondida.
- Los puntos de escape se localizaron en cuatro posiciones diferentes, todos a la misma distancia, fijados aleatoriamente a través de la prueba y se utilizaron los mismos para todos los organismos.
- La plataforma estuvo situada en el cuadrante izquierdo superior (IS), con un punto de referencia.
- Para encontrar la plataforma escondida se realizaron 10 sesiones (2 diarias), con 4 ensayos cada una, con una duración de 1 minuto, si el ratón no encuentra la plataforma pasando 1 minuto, se guio manualmente hasta la plataforma donde permaneció durante 10 segundos.
- Después se le retiro la plataforma y se le dejo descansar por 30 segundos antes de iniciar el siguiente ensayo.
- La medida evaluada fue la latencia de escape (tiempo que transcurre hasta que alcanza la plataforma).

9.3.3 Ensayo del laberinto de agua de Morris (Fase de retención)

- Al finalizar la fase anterior (fase de adquisición), se llevó a cabo la fase de retención. Este ensayo pone a prueba el aprendizaje del organismo, si aprendió a asociar el punto de referencia con la plataforma, nadará más tiempo en el cuadrante meta, es decir donde previamente estaba situada la plataforma.
- La prueba se lleva a cabo dos días después de la última sesión. Para esta sesión consta de 4 ensayos en total, dejando partir al organismo aleatoriamente de los 4 puntos de partida descritos anteriormente.
- La medida evaluada fue el tiempo que permanece en el cuadrante meta (Li *et al.*, 2015 y Sabogal-Guáqueta *et al.*, 2015) (Línea de tiempo 1).



Línea de tiempo 1. Implementación del modelo de inflamación y laberinto de agua de Morris.

9.4 Histoquímica

Para evaluar el tejido cerebral, en la primera etapa se utilizaron 6 grupos de ratones, 3 grupos con una dosis de 5 mg/kg y 3 grupos de 250 µg/kg, 2 grupos fueron tomados a partir de los ratones sacrificados a los 14 días después del LAM, los cuatro grupos restantes fueron sacrificados a los 3 y 7 días, con dosis de 250 µg/kg y 5 mg/kg. Únicamente los grupos sacrificados en el día 3 fueron utilizados para la evaluación de la citocina TNF- α , los grupos restantes se observaron con la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E).

Posteriormente se evaluaron dos grupos sacrificados a las 15 y 24 horas después de la inyección i.p. de LPS únicamente para la dosis de 250 µg/kg. En conjunto se analizaron cinco grupos (15 horas, 24 horas, 3, 7 y 14 días) y se evaluó el ancho de la región CA1 y el número de células picnóticas en la región CA3 del hipocampo bajo la tinción H-E. Finalmente la citocina TNF- α se evaluó a una dosis de 250 µg/kg en los días 3, 7 y 14 en la región CA1 del hipocampo de ratón.

Para llevar a cabo la técnica histológica (anexo A), los ratones fueron sacrificados a través de dislocación cervical, seguida de una disección y la perfusión por gravedad, utilizando EDTA como anticoagulante. Se extrajo únicamente el cerebro para llevar a cabo una deshidratación y fijación en parafina; con ayuda del micrótopo se realizaron los cortes histológicos del hipocampo (anexo B), seguida de una tinción con Hematoxilina-Eosina (anexo C), con la finalidad de observar cambios en la morfología celular. La citocina TNF- α se utilizó como marcador proinflamatorio para evaluar el daño en los cerebros de los ratones, ver anexo E.

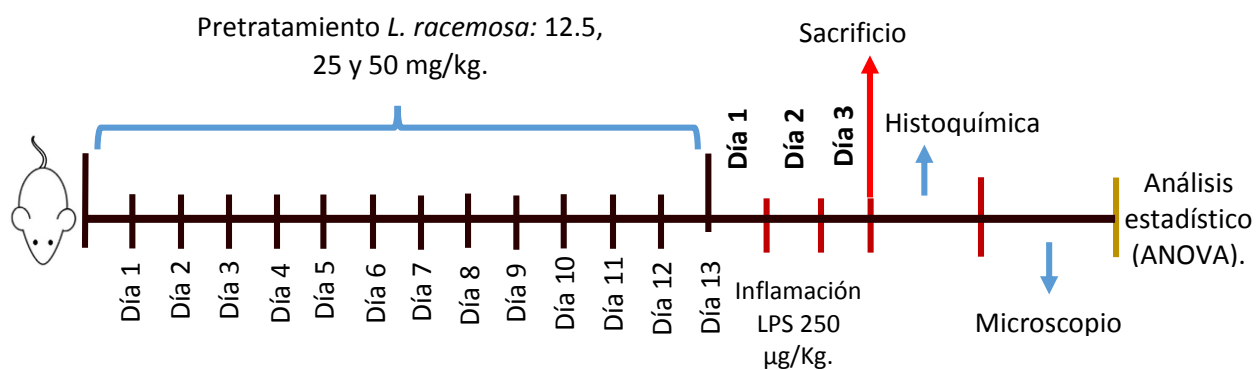
9.5 Evaluación de los extractos de *Lopezia racemosa*

La segunda parte del proyecto se evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto de *L. racemosa*. Previamente se realizó la extracción de la planta (*L. racemosa*), material que fue proporcionado por el grupo de trabajo de la Dra. Irene de la Concepción Perea Arango del Laboratorio de Botánica Estructural (CEIB-UAEM). Se utilizaron únicamente partes aéreas de la planta (tallo y hoja), obteniendo un peso seco total de 49.6g utilizando una mezcla de diclorometano-metanol (1:1), se llevó a sequedad en la campana de extracción una vez cada 72 horas durante 9 días, obteniendo un rendimiento de 10.87g del extracto de *L. racemosa*, se utilizó DMSO al 10% como disolvente.

En la segunda etapa se utilizaron tres dosis diferentes del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*: 12.5, 25 y 50 mg/kg, utilizados como pretratamiento por 13 días inyectados vía i.p., posteriormente se indujo la inflamación por medio del LPS durante tres días, como control positivo se utilizó un grupo tratado con 250 µg/kg de LPS y solución salina al 0.9% como control negativo (tabla 2) (Línea de tiempo 2).

Tabla 2. Tratamientos.

Grupo	Lesión	Tratamiento (inyección vía i.p.)
A (negativo)	Solución salina	Vehiculó (0.9%)
B (positivo)	LPS (O111:B4)	250 µg/kg
C	LPS (O111:B4)	12.5 mg/kg
D	LPS (O111:B4)	25 mg/kg
E	LPS (O111:B4)	50 mg/kg



Línea de tiempo 2. Evaluación del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*.

9.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos por medio del ensayo del laberinto de agua de Morris y cortes histológicos en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratón fueron evaluados por el software GraphPad Prism versión 6.0, bajo un estadístico de t-Student, ANOVA, con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$ y pruebas post hoc: Tukey y Dunnett's.

10. Resultados

La primera parte del trabajo se establecieron las condiciones adecuadas para realizar la prueba conductual, se evaluó la administración del LPS sobre la prueba de memoria espacial y los cambios a nivel histológico en dos regiones del hipocampo CA1 y CA3. La segunda parte se observó efecto antiinflamatorio de *L. racemosa* en la región CA1 del hipocampo.

10.1 Evaluación de la memoria espacial

La prueba de LAM consiste en dos fases: 1) de adquisición y 2) de retención. Inicialmente se determinó si el horario y la edad de los ratones influían en el resultado de la prueba.

10.1.1.1 Influencia del horario en la memoria espacial

Se evaluaron dos grupos de 5 individuos en dos diferentes horarios: 8:00 am (mañana: **m**) y 17:00 pm (tarde: **t**). En la fase de adquisición se observó una disminución del tiempo o latencia de escape con respecto al número de sesiones, presentando valores de inicio de: 38.3 ± 6.4 s para el grupo de la mañana (**m**) y 33.9 ± 6.4 s para el grupo de la tarde (**t**). Estos valores disminuyeron considerablemente para la sesión número 5 obteniendo registros de 9.3 ± 1.9 s (**m**) y 7.9 ± 3.2 s (**t**). A partir de esta sesión y hasta la sesión número 10, el tiempo de latencia de escape disminuyó ligeramente, llegando a valores de 5.8 ± 1.3 s y 5.8 ± 1.1 s respectivamente (figura 4). Ambos grupos mostraron un comportamiento similar, lo que fue corroborado con el análisis estadístico (t de Student). El análisis nos indica que no hubo diferencia significativa en el tiempo de escape entre los grupos de la mañana y de la tarde.

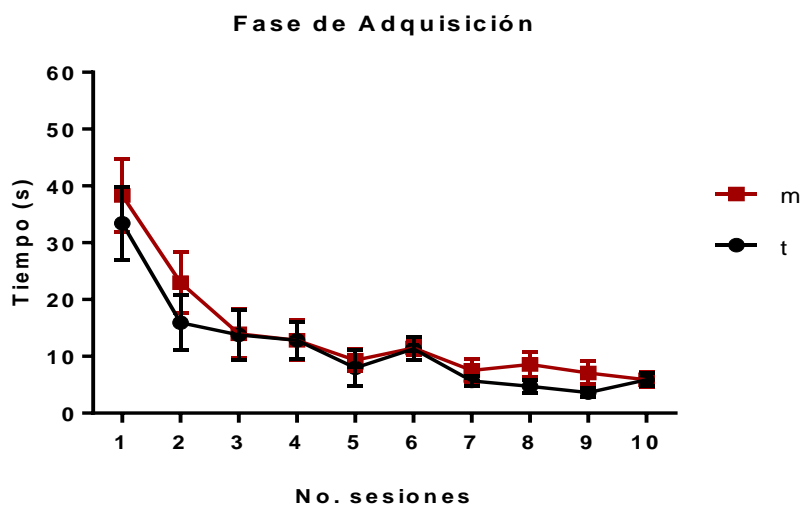


Figura 4. LAM: Fase de adquisición, t de Student, $p < 0.05$, $n = 5$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). **m**: grupo de la mañana y **t**: grupo de la tarde.

En la fase de retención, se obtuvieron valores de $35.6 \pm 3.1s$ para el grupo **m** y $20.6 \pm 2.4s$ para el grupo **t** (figura 5). El análisis estadístico t de Student con una $p < 0.05$ demuestra una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, lo que indica que el horario en el que se realice el ensayo repercute directamente en esta fase, el horario de la mañana demostró ser el mejor tiempo para realizar el ensayo (LAM).

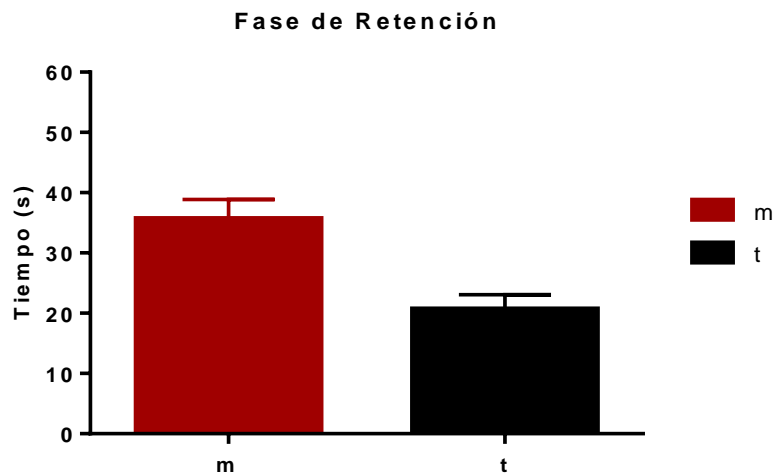


Figura 5. LAM: Fase de retención, t de Student, $p < 0.05$, $n=5$, ($\bar{X} \pm SEM$). **m**: grupo de la mañana y **t**: grupo de la tarde.

10.1.1.2 Influencia de la edad de los ratones en la memoria espacial

Una vez establecido el horario de la prueba del LAM, se determinó si la edad de los ratones afectaba el resultado de la prueba. Los ratones analizados fueron: grupo de ratones jóvenes (J: 1 mes de edad) y de ratones adultos (A: 6 meses de edad). En la primera fase de adquisición se observó la misma tendencia en ambos grupos, con respecto al tiempo de escape. Una disminución considerable fue observada entre la sesión número 4 y 6 con respecto al tiempo de inicio; posterior a la sesión 6 los grupos se mantuvieron estables hasta la última sesión con valores de $5.8 \pm 1.3s$ (J) y $8.3 \pm 2.3s$ (A) (figura 6). El análisis t de Student demuestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de ratones.

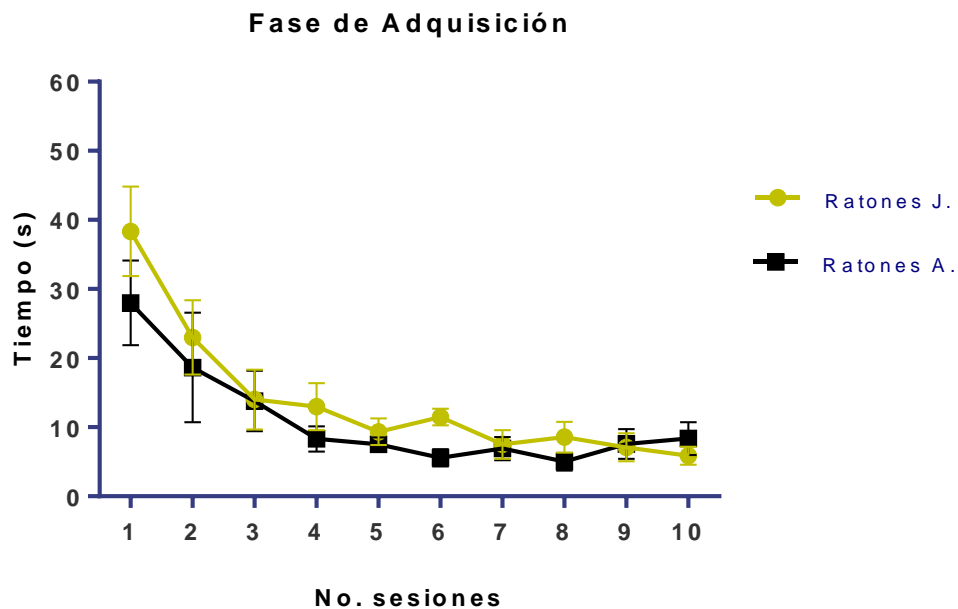


Figura 6. LAM: Fase de adquisición, t de Student, $p < 0.05$, $n = 5$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Ratones jóvenes (J) y Ratones adultos (A).

En la fase de retención ambos grupos demostraron la misma capacidad de retención (figura 7); los valores de permanencia en el cuadrante meta fueron de 35.7 ± 3.1 s para los jóvenes (J) y 28.0 ± 4.8 s para los adultos (A). Este resultado nos indica que la edad no influye en el aprendizaje, ventaja que se utiliza para evaluar a grupos de ratones de edad temprana o tardía.

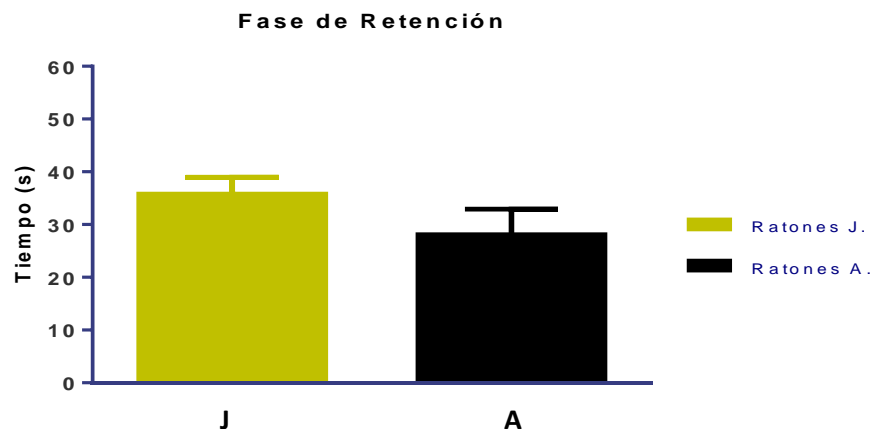


Figura 7. LAM: Fase de retención, t de Student $p < 0.05$, $n = 5$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Ratones jóvenes (J) y Ratones adultos (A).

10.1.2 Efecto del LPS sobre la prueba conductual del LAM

Una vez establecidos los parámetros de la prueba de LAM, se evaluó el efecto del lipopolisacárido (LPS, 0111:B4) sobre la memoria espacial de los ratones. Se utilizaron dos dosis: aguda de 5mg/kg y una crónica 250µg/kg. Los resultados obtenidos se compararon con dos grupos controles; 1) normal y 2) grupo que recibió únicamente el vehículo durante siete días. Como se puede observar en la figura 8, los cuatro grupos siguen la misma tendencia, con una disminución del tiempo de escape a medida que avanza el número de sesiones; el análisis estadístico de ANOVA, indica que no existe diferencia significativa entre los grupos.

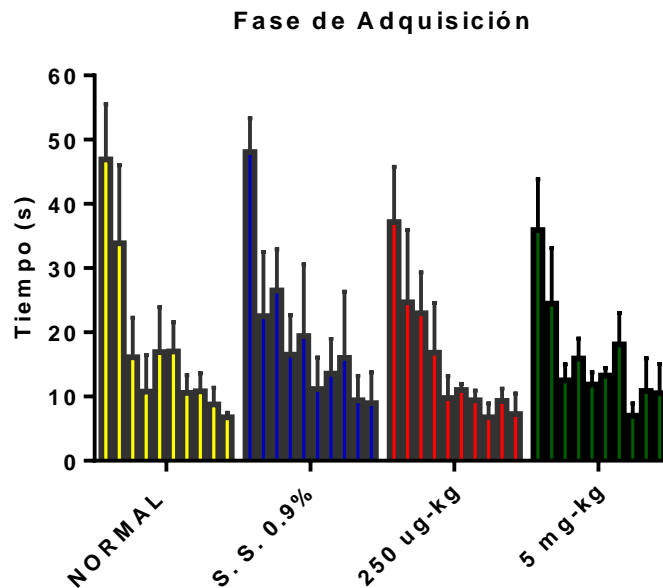


Figura 8. LAM: Fase de adquisición, ANOVA $p < 0.05$, $n = 3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Grupo: Normal, vehículo (solución salina 0.9%), crónico (250µg/kg) y agudo (5mg/kg).

Con respecto a la fase de retención, los tiempos de nado observados en el cuadrante meta para los cuatro grupos fueron los siguientes: Control: 32.5 ± 7.0 s; S.S.: 24.5 ± 2.1 s; 250µg/kg: 33.3 ± 2.9 s; y 5mg/kg: 27.6 ± 1.4 s. Los grupos tratados con LPS presentaron tiempos similares a los controles, demostrando la misma tendencia en permanecer en el cuadrante donde previamente se encontraba la plataforma de escape, no existe diferencia significativa, corroborado por el análisis estadístico de ANOVA, el LPS no afecta la memoria espacial en los ratones (figura 9).

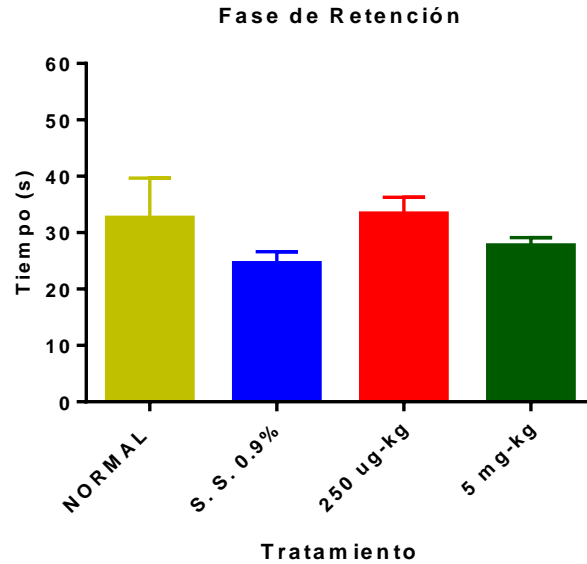


Figura 9. LAM: Fase de retención, ANOVA $p < 0.05$, $n=3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Grupo: Normal, vehículo (solución salina 0.9%), crónico (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y agudo (5 mg/kg).

10.1.3 Efecto del LPS a nivel histológico

Los cortes de los tejidos control no presentaron cambios morfológicos (figura 10A, E e I); las neuronas ubicadas en la región CA1 y CA3 del hipocampo no presentan cambios, se observó una morfología celular normal: células redondas con núcleos normales no picnóticas, donde se aprecian los núcleos y prolongaciones normales (figura 10B, C, F, G, J y K). No se presentó diferencia entre los grupos de ratones: jóvenes, adultos y control. El análisis inmunohistoquímico demostró que no existe expresión de TNF- α en las células CA1 del hipocampo (figura 10D, H y L).

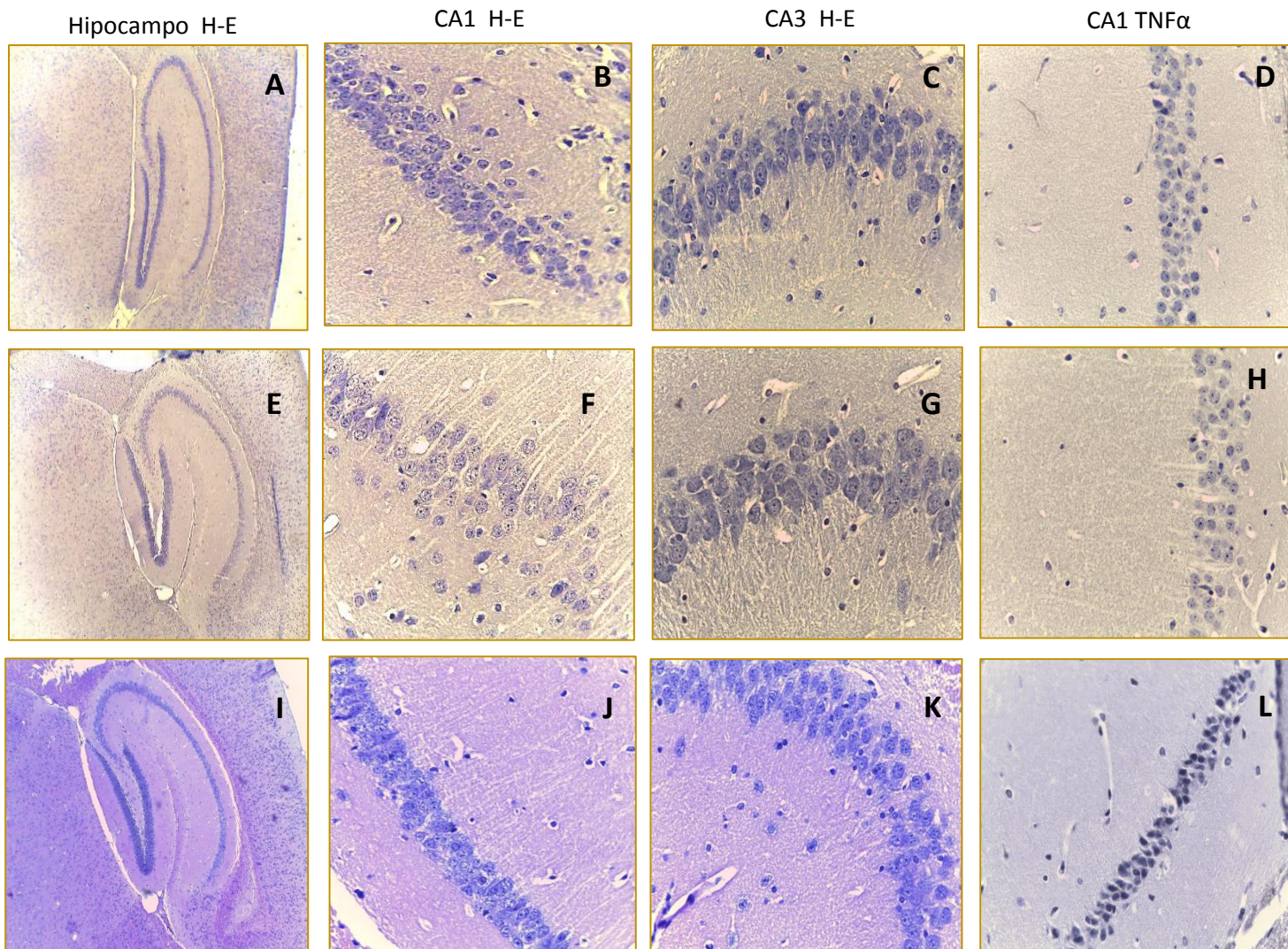


Figura 10. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, CA3 y TNF α en CA1 de ratón.
A: Hipocampo **B:** CA1 **C:** CA3 y **D:** CA1 (TNF α) de ratón joven, observadas a 10X y 40X.
E: Hipocampo, **F:** CA1, **G:** CA3 y **H:** CA1 (TNF α) de ratón adulto, observadas a 10X y 40X.
I: Hipocampo, **J:** CA1, **K:** CA3 y **L:** CA1 (TNF α) grupo vehículo, observadas a 10X y 40X.

Los grupos evaluados en el día 3 presentaron un hipocampo normal (figura 11A y E). Las células piramidales en la región CA1 de ambos grupos presentaron morfología redondas y picnóticas; y a diferencia de la región CA3 se observaron células no circulares y mayor picnosis (ver flechas rojas (figura 11B, C, F y G). La expresión de TNF- α en las células de la región CA1 del hipocampo presentaron un marcaje muy ligero como se indica con las flechas verdes (figura 11D y H).

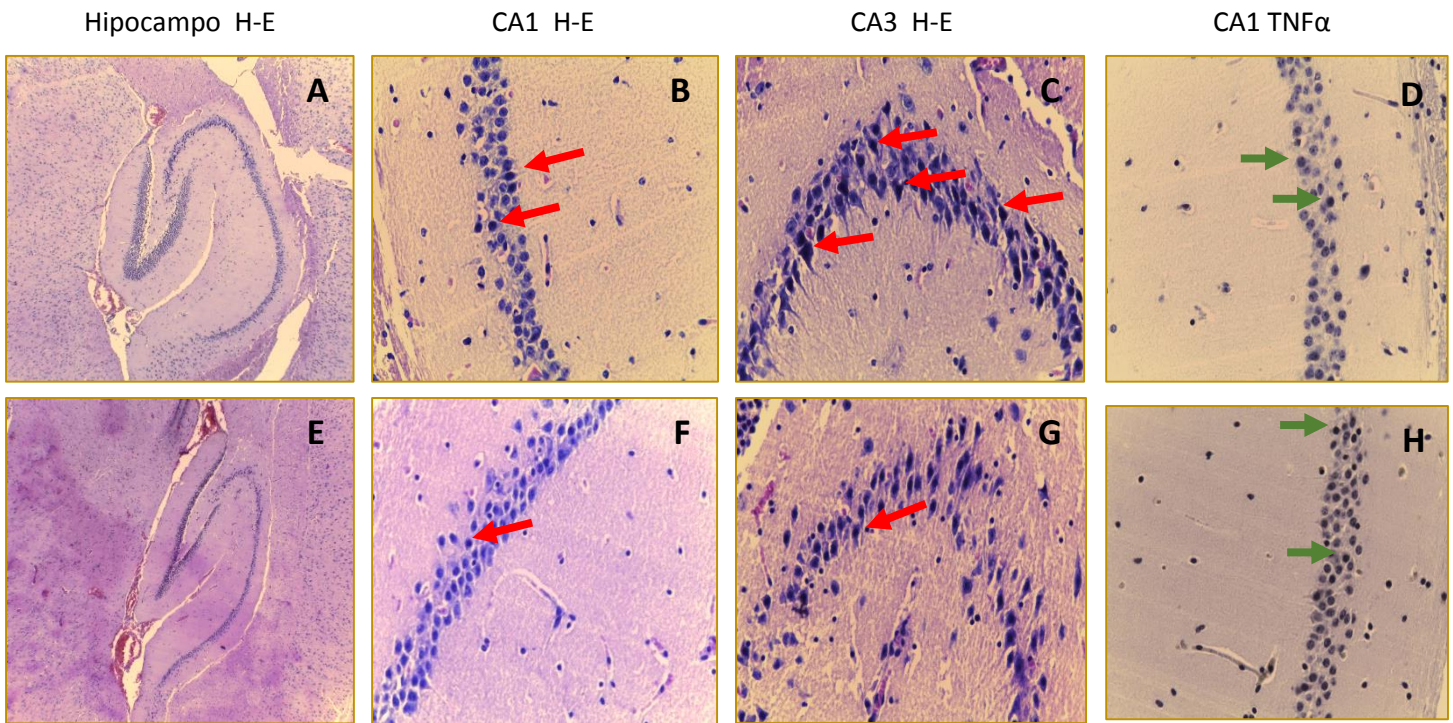


Figura 11. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, CA3 y TNF α en CA1 de ratón.
Grupo agudo (5mg/kg). A: Hipocampo, B: CA1, C: CA3 y D: CA1 (TNF α), observadas a 10X y 40X.
Grupo crónico (250µg/kg). E: Hipocampo, F: CA1, G: CA3 y H: CA1 (TNF α), observadas a 10X y 40X.

Los dos grupos analizados en el séptimo día (agudo y crónico), bajo la tinción de H-E, presentaron un hipocampo normal (figura 12A y D). Se observó picnosis en las células de la región CA1 y CA3 del grupo agudo (ver flechas rojas figura 12B y C), a diferencia del grupo crónico, las células tienen forma redonda y no presentan picnosis (flechas negras figura 12E y F).

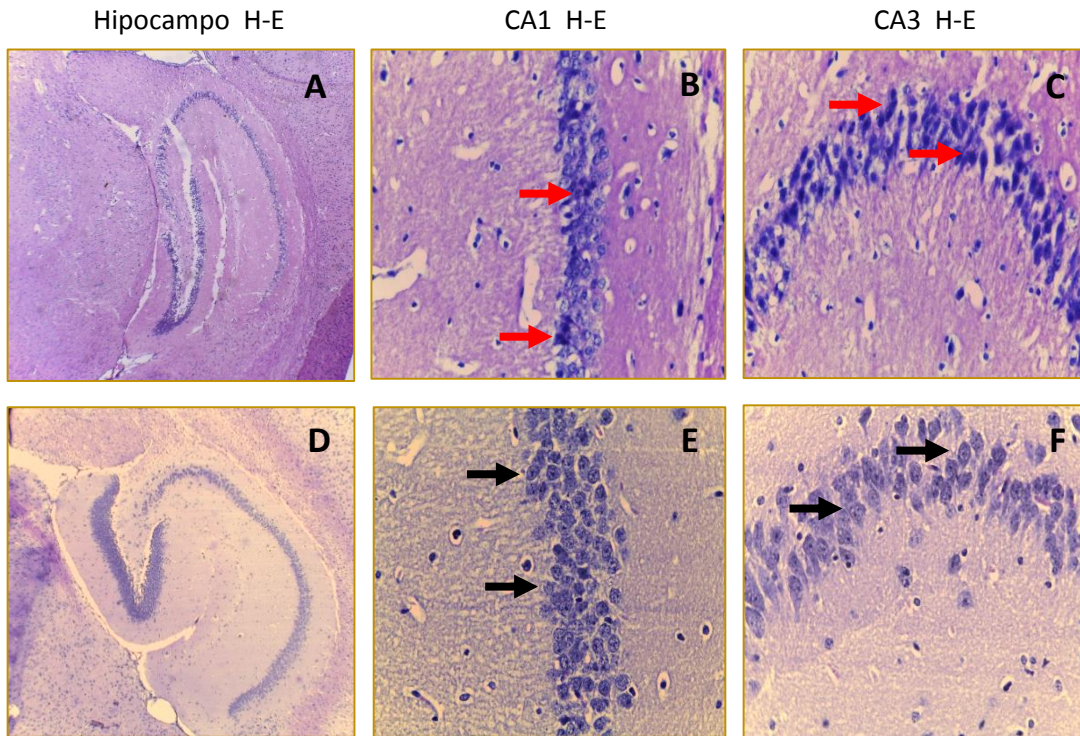


Figura 12. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, y CA3 de ratón.
Grupo agudo (5mg/kg). A: Hipocampo, B: CA1 y C: CA3 observadas a 10X y 40X.
Grupo crónico (250µg/kg). D: Hipocampo, E: CA1 y F: CA3 observadas a 10X y 40X.

Los resultados observados en el día 14 demostraron que no existen cambios en el hipocampo (figura 13A y D). Así mismo se observó daño en la región CA1 y CA3 del grupo agudo, mayor picnosis, células no redondas y presencia de retracción celular, a diferencia del grupo tratado de manera crónica por 7 días (ver flechas rojas figura 13B y C). Las células de la región CA1 y CA3 del grupo crónico únicamente presentaron células redondas y no picnóticas (ver flechas negras, figura 13E y F).

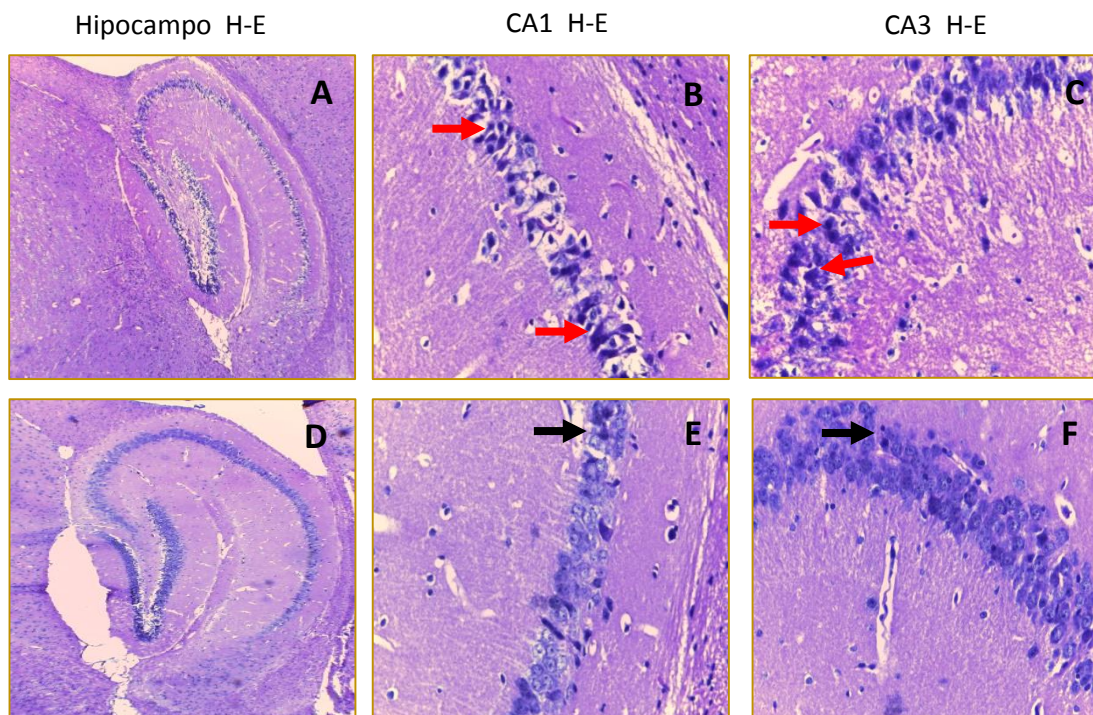


Figura 13. Tinción histológica de H-E (Hematoxilina-Eosina) del hipocampo, CA1, y CA3 de ratón.
Grupo agudo (5mg/kg). A: Hipocampo, B: CA1 y C: CA3 observadas a 10X y 40X.
Grupo crónico (250µg/kg). D: Hipocampo, E: CA1 y F: CA3 observadas a 10X y 40X.

10.1.4 Análisis estadístico de la región CA1 y CA3 del hipocampo de ratón

10.1.4.1 Evaluación del ancho de la región CA1 del hipocampo en ratones

El análisis de cinco tratamientos evaluados a diferentes tiempos utilizando dos grupos como control, el ancho de la región CA1 fue comparada contra cada grupo, observando valores de: Normal: $322.7 \pm 37.0 \mu\text{m}$, solución salina: $236.2 \pm 39.2 \mu\text{m}$, 15 horas: $304.6 \pm 20.9 \mu\text{m}$, día 1: $289.4 \pm 27.6 \mu\text{m}$, día 3: $222.9 \pm 21.3 \mu\text{m}$, día 7: $310.4 \pm 32.3 \mu\text{m}$ y día 14: $247.0 \pm 15.1 \mu\text{m}$. Se observó una tendencia a la disminución del ancho de CA1 únicamente en el día 3 con respecto al control normal, el resto de los grupos tratados presentaron una similitud con respecto a los controles. Como lo corrobora el análisis estadístico ANOVA, no existe diferencia significativa entre los grupos evaluados (figura 14).

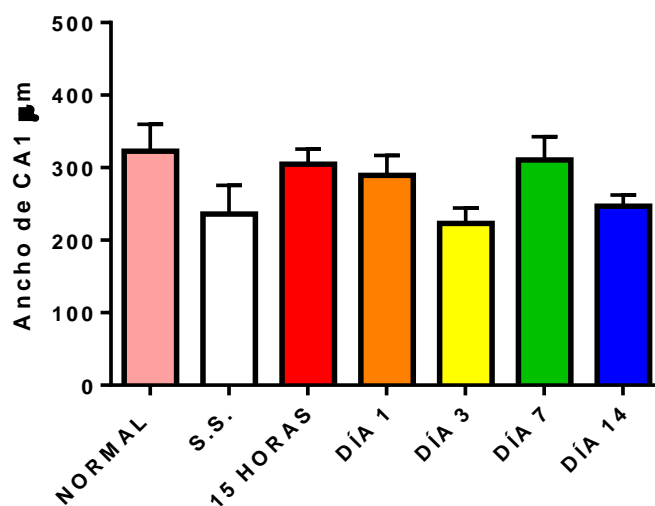


Figura 14. Ancho de la región CA1 (μm) del hipocampo. ANOVA $p < 0.05$, $n=3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Dosis de $250\mu\text{g/kg}$ de LPS. Normal, Control (solución salina 0.9%), 15 horas, Días 1, 3, 7 y 14.

10.1.4.2 Evaluación de células picnóticas en la región CA3 del hipocampo

Los resultados observados en la región CA3 del hipocampo indican la presencia de daño en las neuronas piramidales a partir de las 15 horas con un número de 34.0 ± 1.5 células picnóticas. Este daño se mantiene similar en el día 1 y 3 observando 36.3 ± 7.8 y 35.6 ± 4.9 células, posteriormente el número de células disminuye considerablemente en el día 7 y se mantiene hasta el día 14 con un conteo de 4.6 ± 1.2 . Posteriormente el análisis de ANOVA demostró una diferencia significativa entre tratamientos con una $p < 0.05$, el análisis Tukey demostró la similitud entre los tratamientos: 15 horas, días 1 y 3, así como la diferencia entre los tratamientos: día 7 y 14 debido a la disminución de células picnóticas observados en ambos grupos (figura 15).

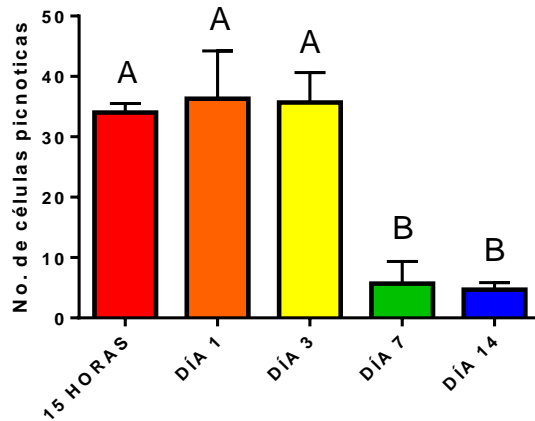


Figura 15. Número de células picnóticas en la región CA3 del hipocampo. ANOVA $p < 0.05$ y Tukey, $n = 3$, ($\bar{X} \pm$ SEM). Dosis de ($250 \mu\text{g}/\text{kg}$) de LPS. Grupo: 15 horas, Días 1, 3, 7 y 14.

10.1.4.3 Evaluación inmunohistoquímica en la región CA1 del hipocampo de ratón

Los datos observados en el conteo de células reactivas en la región CA1 del hipocampo fue evaluado en análisis estadístico ANOVA y demostró una diferencia significativa entre los grupos con una $p < 0.05$, posteriormente el análisis de Dunnett's indicó una diferencia de TNF- α en el día 3 con un promedio de 44.0 ± 3.9 células reactivas con respecto al día 7 y 14 con promedios de 31.2 ± 8.0 y 20.7 ± 4.0 respectivamente. Así mismo se presentó una disminución de las células reactivas con respecto al tiempo (figura 16).

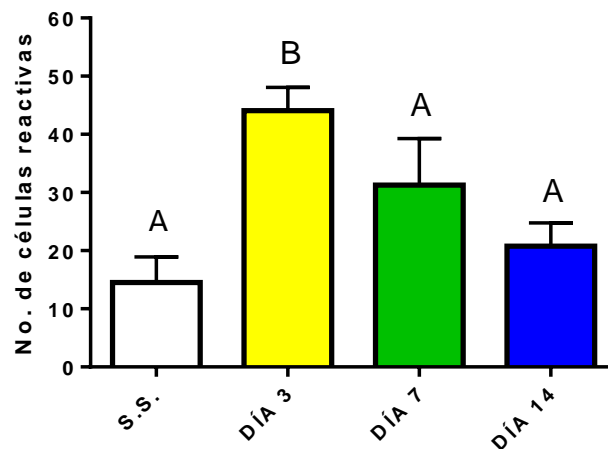


Figura 16. Número de células reactivas para TNF- α en la región CA1 del hipocampo ANOVA $p < 0.05$, Dunnett's, $n = 3$, ($\bar{X} \pm$ SEM). Dosis de ($250 \mu\text{g}/\text{kg}$) de LPS Grupo: Control (solución salina 0.9%), Días 3, 7, y 14.

El color café se identifica como el marcaje positivo de células que expresan la citocina. Se colocó una imagen representativa de la región CA1 del hipocampo de cada tratamiento con respecto a la figura 16 descrita anteriormente. El día 3 presentó mayor expresión de la citocina TNF- α (flechas rojas figura 17B). El menor número de células reactivas se observaron en los días 7 y 14 (figura 17C y D). Por lo tanto se decidió utilizar el día 3 para obtener el mayor número de células reactivas y llevar a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*.

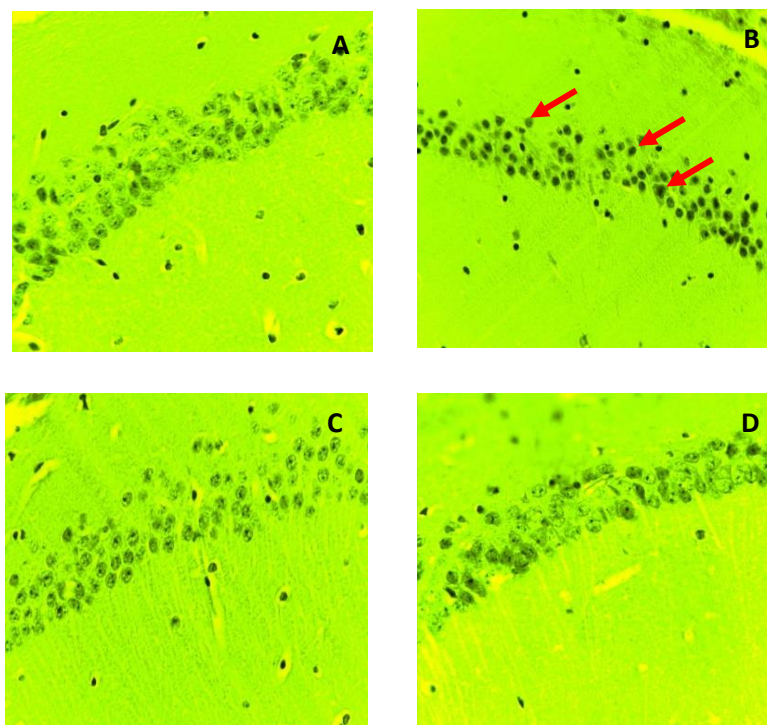


Figura 17. Inmunohistoquímica para TNF- α en CA1 de ratón, dosis de 250 μ g/kg de LPS a diferentes tiempos: A) Control (S.S. 0.9%), B) Día 3, C) Día 7 y D) Día 14.

10.2 Evaluación inmunohistoquímica del extracto diclorometano-metanol antiinflamatorio de *L. racemosa* en la región CA1 del hipocampo de ratón

El extracto de *L. racemosa* fue evaluada en tres diferentes dosis con respecto al nivel de respuesta de TNF- α en las células de la región CA1 del hipocampo de ratón. Cada resultado fue analizado con la prueba de ANOVA, que indicó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados (figura 18). Se realizó el análisis post hoc de comparación múltiple de Dunnett's en el que se evaluó el control positivo LPS contra todos

los tratamientos. La dosis de 50 mg/kg demostró el mejor efecto antiinflamatorio, observando una disminución de 44.0 ± 3.9 a 27.5 ± 3.5 células que expresan la citocina TNF- α .

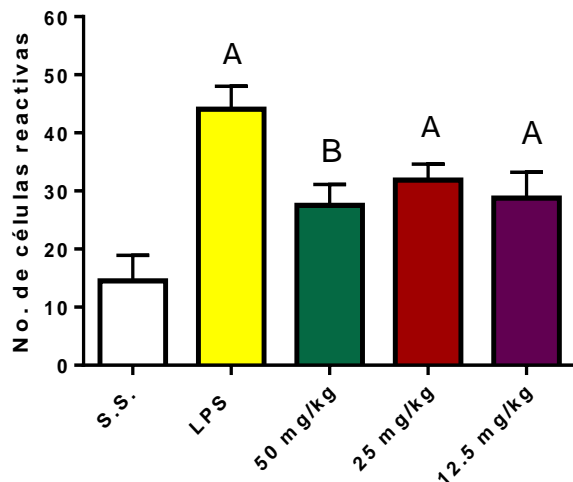


Figura 18. Número de células reactivas para TNF- α en la región CA1 del hipocampo. ANOVA $p < 0.05$, Dunnett's, $n=3$, ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Grupos: Control negativo (solución salina 0.9%), control positivo LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 12.5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg.

Finalmente se presentan las imágenes de cada tratamiento en la región CA1 del hipocampo con respecto a la evaluación del extracto de *L. racemosa* (figura 19C, D y E). Como control negativo se utilizó solución salina (figura 19A) y como control positivo el grupo dañando con LPS (flechas rojas, figura 19B). Se llevó a cabo la comparación y se observó el aumento de células normales en la región CA1 del hipocampo (flechas azules, figura 19E), demostrando una disminución de daño neuronal a una dosis de 50 mg/kg, con respecto a la dosis de 12.5 mg/kg y 25 mg/kg (figura 19C y D).

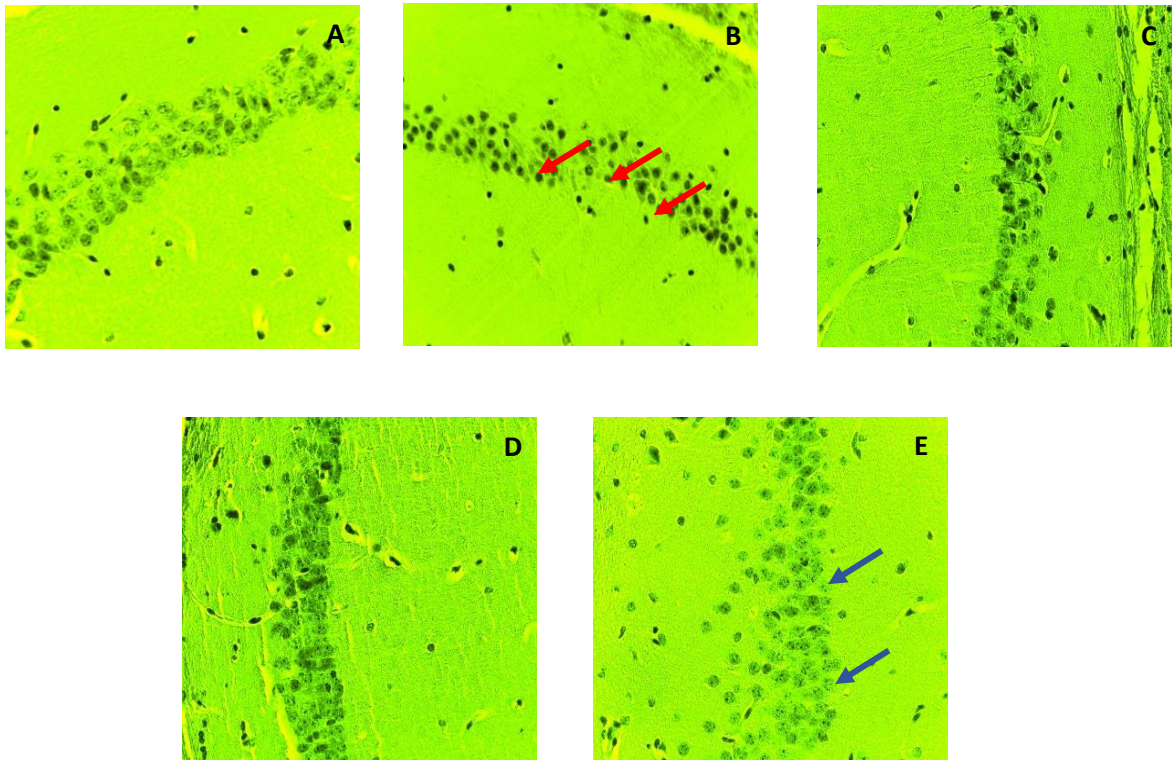


Figura 19. Inmunohistoquímica de TNF- α en CA1 del hipocampo de ratón. Grupos: A. Control negativo (solución salina 0.9%), B control positivo LPS 250 μ g/kg, C: 12.5 mg/kg, D: 25 mg/kg y E: 50 mg/kg del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*.

11. Discusión

La importancia de esta investigación radica en la demostración de la actividad antiinflamatoria del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*, actividad a nivel cerebral, frente a la disminución de la citocina proinflamatoria TNF- α .

El establecimiento de los parámetros del ensayo de LAM, prueba que evalúa la memoria espacial, fue el primer punto evaluado. El efecto del horario para la realización de la prueba y la edad fueron parámetros estudiados. Los resultados con respecto al horario nos indican que la fase de adquisición es independiente al horario, sin embargo, la fase de retención es dependiente del horario, y repercute de forma negativa en el horario de la tarde. Se ha reportado que múltiples factores pueden influir en el comportamiento de los organismos, como el género, el peso, la intensidad de luz y los esquemas de manipulación son ejemplos de estos factores en ratas (Conde *et al.*, 2008). En nuestros datos, con respecto al factor edad, éste no limita la realización del ensayo (LAM) en los ratones CD1 evaluados; datos similares son reportados en un estudio con ratones con una edad entre 4 y 21 meses, en el que observaron que el factor edad no limita la fase de adquisición y retención en la memoria

espacial, prueba que fue llevada a cabo con el ensayo de LAM (Sabogal-Guáqueta *et al.*, 2014 y Li *et al.*, 2015). Tomando en cuenta nuestros resultados de los experimentos del LAM, los estudios posteriores se realizaron por la mañana y con un rango de edad de los ratones de entre 3-6 meses. Una vez establecidos estos parámetros se evaluó el efecto de LPS (O111:B4) en la memoria espacial de los ratones.

Diferentes estudios han demostrado el daño a nivel cerebral inducido por la i.p. del LPS y la asociación de esta molécula a las placas seniles, una de las características que lleva a la muerte neuronal y dirige a la pérdida de memoria como se presenta en los pacientes con la EA (Xinhua *et al.*, 2016). Los resultados presentados en este trabajo difieren debido a la ausencia de daño a nivel de memoria espacial en ambos grupos (crónico y agudo) observados en el LAM, posiblemente a la resistencia de la cepa CD1 al efecto inflamatorio del compuesto utilizado, así como el tiempo de exposición del compuesto no fue suficiente para observar la pérdida de memoria espacial característica del EA. Por lo tanto, algunos de los parámetros que se deben considerar para un estudio a futuro son: a) la cepa de ratón al momento de implementar el modelo; b) el tipo de serotipo de la bacteria de *E. coli* de donde se aísla la molécula de LPS; y c) el tiempo de administración del LPS (Vorhees y Williams, 2006).

Las características de daño a nivel histológico se presentaron en las células de la región CA1 y CA3 del hipocampo, así como la activación de la microglía, un importante mediador de la neuroinflamación, que participa en la liberación de varias sustancias potencialmente neurotóxicas, como especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y varias citocinas proinflamatorias, de las cuales se consideran generalmente dos citocinas proinflamatorias principales, TNF- α e IL-1 β , que incrementan de manera considerable una vez que el cerebro ha sufrido daño (Xing *et al.*, 2011). Un efecto similar se ha observado por la inyección vía i.p. LPS en ratones (Woong *et al.*, 2008). La cepa evaluada en este estudio demostró una respuesta al daño ocasionado por el LPS en cada uno de los tiempos evaluados. Las células picnóticas se utilizaron como marcador de daño a nivel celular, mismas que fueron observadas en las células de la región CA1 y CA3 del hipocampo, daño que compromete la integridad neuronal. Sin embargo, no se observaron cambios en la estructura hipocampal, probablemente debido al corto tiempo de exposición del LPS. Datos similares reportan pérdida selectiva de neuronas en hipocampo y corteza cerebral que están relacionadas con la EA (Bernhardi., 2005 y Nieto-Escamez., 2011). Es importante mencionar el incremento de la citocina TNF- α en el día 3 y como disminuye con respecto al tiempo (Figura 15). En un estudio realizado por Qun y colaboradores en el 2014, se reportó la expresión relativa

de RNAm de TNF- α total en hipocampo en el séptimo día, sin embargo al realizar la medición por el método de ELISA del suero total del hipocampo, detectaron la presencia de TNF- α desde el día 1 (26.0 pg/mg) hasta el día 7 (25.9 pg/mg). Se ha observado niveles de TNF- α sorprendentemente elevados en el cerebro hasta 10 meses después de su activación (Qin *et al.*, 2007), lo que indica que el tiempo de administración y espera son parte importante para observar la respuesta de algunas de las características de las enfermedades neurodegenerativas.

La implementación de modelos inflamatorios del cerebro permiten comprender la posible transición del estado de neuroinflamación a la neurodegeneración y probar la eficacia de los posibles agentes terapéuticos para evitar dicha transición (Nazem *et al.*, 2015). En este trabajo se demostró el efecto antiinflamatorio del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa* aplicado vía i.p. en el modelo *in vivo* inflamatorio de LPS, efecto observado a una dosis de 50 mg/kg del extracto (diclorometano-metanol). La actividad antiinflamatoria demostrada por Salinas y colaboradores en el 2014, pero en diferente modelo de estudio, observaron que *L. racemosa* presentó un efecto antiinflamatorio en el modelo de edema de oreja de ratón. Se evaluó un extracto diclorometano, observando una inhibición antiinflamatoria de 86.2%. Éstos son resultados similares reportados por Moreno-Anzures y colaboradores en el 2017, que a partir del extracto diclorometano-metanol obtenido de una línea de raíces pilosas de *L. racemosa* mostró una inhibición del 85.6% en el mismo modelo de edema de oreja de ratón, atribuyendo el efecto antiinflamatorio a un derivado de campesterol (23,28-tetrahidroxi-14,15-dehydrocampesterol). Se ha demostrado en este modelo *in vivo* que *L. racemosa* contiene moléculas con capacidad antiinflamatoria, y se desconoce si en ambos modelos la (s) molécula (s) están contribuyendo de igual manera para la actividad.

Se ha observado que los extractos de los miembros de la familia *Onagraceae* tienen diversos efectos biológicos. Estas propiedades se deben a su alto contenido de polifenoles, tales como los taninos y flavonoides. Oenothin B es el tanino principal aislado de *Epilobium* y *Oenothera* (géneros pertenecientes a la familia *Onagraceae*); seguido de otros flavonoides: miricetin y quercitina, debido a su abundancia de Oenotein B se considera como agente antioxidante (Cruz *et al.*, 2013). Por otra parte Fiebich y colaboradores en el 2001, observaron que un extracto de harpagofito era capaz de inhibir la síntesis de TNF- α inducida por LPS en monocitos humanos, debido a que este extracto contiene como

principio activo iridoides, aminoácidos, ácidos fenólicos, flavonoides, heterosidos y fitosteroles (beta-sitosterol y estigmasterol).

Así mismo se ha observado la inhibición de los fitosteroles sobre la producción de TNF- α (Pineda *et al.*, 2005). Se han reportado la presencia de estos compuestos en plantas con propiedades antiinflamatorias como lo observado en *Portulaca oleracea L.*, que tradicionalmente se ha utilizado debido a sus propiedades antiinflamatorias, debido a la presencia de compuestos como β -sitosterol y estigmasterol, aislados de las hojas de esta planta. (Alba-de-Armas *et al.*, 2015).

La presencia de estos compuesto se han observado en los extractos de semillas de girasol (*Helianthus sp.*), donde se reportaron diferentes fitoesteroles como campesterol, estigmasterol, delta-5-avenasterol, delta-7-estigmasterol, detal-7-avenasterol y β -sitosterol (Fernández-Cuesta *et al.*, 2011). Así mismo se ha observado la actividad de otras moléculas relacionadas con la actividad antiinflamatorio como flavonoides, cumarinas, saponinas, terpenoides, alcaloides, lignados y acido tánico (Peñaherrera *et al.*, 2016). Los compuestos presentes en los extractos pueden ejercer una actividad antiinflamatoria como las observadas en este estudio con la planta *L. racemosa*, lo que nos indica el potencial que tienen estos compuestos como agentes antiinflamatorios. Con base a esto podemos concluir que en nuestro modelo *in vivo* de neuroinflamación de ratón se logró observar el efecto antiinflamatorio del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa* a través de la inhibición en la expresión de la citocina TNF- α , utilizada como marcador neuroinflamatorio en las células piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo de ratón.

12. Conclusiones

- La administración aguda y crónica del LPS no afecta la memoria espacial de los ratones.
- El efecto de daño cerebral a nivel histológico fue observado en la región CA1 y CA3 del hipocampo de ratón con ambas dosis.
- Se observó la expresión de TNF- α en la región CA1 del hipocampo, de los organismos tratados con LPS.
- El extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa* presentó el efecto antiinflamatorio a una dosis de 50 mg/kg.

13. Perspectivas

- Aumentar el tiempo de administración de LPS, para observar el efecto en la pérdida de memoria espacial.
- Evaluar un mayor rango de concentración del extracto diclorometano-metanol de *L. racemosa*.
- Purificar el extracto y obtener los derivados de campesterol para su evaluación en el modelo *in vivo*.
- Realizar un estudio biodirigido que permita identificar los compuestos presentes en el extracto de *L. racemosa* responsables del efecto antiinflamatorio en el cerebro de ratón.
- Validar el efecto antiinflamatorio del extracto, fracciones activas o compuestos aislados en otros modelos de neuroinflamación, en ratones transgénicos (proteína Tau, β -amiloide y APP).

14. Anexos

A) Disección y Perfusión

- Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.
- Se fijaron de las cuatro extremidades en un soporte.
 - Se diseccionaron empezando por la parte ventral del cuerpo hasta llegar al corazón, con ayuda de una navaja y tijeras de disección.
 - Con ayuda de una jeringa se aplicaron 20 μ L de EDTA en el ventrículo izquierdo, posteriormente se cortó la aurícula derecha para que empiece el desangrado del organismo.
 - Se colocó la solución salina al 0.9% en el ventrículo izquierdo para comenzar el lavado y finalmente el paraformaldehído al 10% para fijarlo.

Posteriormente, con ayuda de unas tijeras se decapitó al organismo y se dejó al descubierto el cerebro, para seguir con la técnica histológica, donde se realizaron cortes de las regiones de hipocampo.

B) Deshidratación y Fijación en Parafina

1. Lavado con agua 100% (para quitar el exceso de formaldehído).
2. Deshidratación progresiva
 - 1-etanol al 60% por 30 minutos.
 - 1-etanol al 70% por 30 minutos.
 - 1-etanol al 80% por 30 minutos.
 - 1-etanol al 100% (96) 1^{er} por 30 minutos.
 - 1-etanol al 100% (96) 2^{do} por 30 minutos.
 - 1-etano absoluto 1^{er} por 1 hora.
 - 1-etanol absoluto 2^{do} por una hora.
 - 1-etanol: xilol (1:1) por una hora.
 - 1-xilol al 100% 1^{er} por una hora.
 - 1-xilol al 100% 2^{do} por una hora.
 - 1-parafina 1^{er} por una hora.
 - 1-parafina 2^{do} por una hora.

3. Uso del micrótopo

- 4-6 μm de espesor del tejido.
- Se extienden los cortes con una gota de alcohol.
- Se pasan los cortes a baño de flotación (agua con gelatina a una temperatura aproximada de 40-45°C). Esto ayudará a que los cortes plegados en ondulaciones se estiren en el portaobjetos.
- limpiar alrededor para quitar el exceso de gelatina y se dejan secar.

C) Tinción de Hematoxilina–Eosina

1- Etiquetado de laminillas.

2- Desparafinado y rehidratación de los cortes. Sumergir las laminillas en:

- Xilol por 20 minutos.
- Etanol absoluto por 3 minutos, 2 veces.
- Etanol de 96° por 3 minutos, 2 veces.
- Etanol de 80° por 3 minutos.
- Agua destilada, enjuague.

3- Tinción

- Introducir las laminillas de 3 a 7 minutos en hematoxilina de Harris (previamente filtrada).
- Enjuagar en agua de llave, hasta que los restos queden transparentes.
- Sumergir rápidamente en solución de NH_4OH al 1% (agua amoniacal), y observar un viraje de color azul morado.
- Enjuagar con agua de llave.
- Introducir por 1 minuto las laminillas en eosina.
- Enjuagar con agua de llave.

4- Deshidratación

- Etanol al 80% por 3 minutos.
- Etanol al 100% (96) por 3 minutos, 2 veces.
- Etanol absoluto por 3 minutos, 2 veces.

5- Aclaramiento

- Etanol-xilol (1:1) por 3 minutos.
- Xilol por 3 minutos, 2 veces.

- Montaje con resina. Secar las laminillas con cuidado de no maltratar el tejido, y agregar una gota de resina, preferencialmente al centro del corte. Colocar un cubreobjetos y limpiar los excesos con xilol. Dejar secar y observar al microscopio.

D) Salinización de laminillas

- 1- Sumergir los portaobjetos en una solución salina de silano (Trimetoxina, sigma Aldrich R) al 2% en acetona por 6 minutos.
- 2- Enjuagar por 3 minutos en agua destilada, dos veces.
- 3- Secar las laminillas, en estufa a 40°C o temperatura ambiente.

E) Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ)

Para tejido incluido en parafina (IHQ-P)

- 1- Etiquetar las laminillas con lápiz de punta diamante.
- 2- Desparafinar y rehidratar cortes, con pases en etanol y enjuagar con agua destilada.
- 3- Recuperación antigénica.
 - Colocar las laminillas en köplins de plástico, con buffer de citrato de sodio + tritón al 0.2% (pH: 6.0).
 - Hervir por 1 minuto, en olla de presión.
 - Enfriar a temperatura ambiente, o sumergir en agua fría.
 - Enjuagar con buffer de fosfato (PBS 0.1M; pH 7.4) por 5 minutos, 2 veces.
- 4- Eliminación de la actividad peroxidasa
 - Agregar solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%, por 10 minutos.
 - Enjuagar con PBS, 2 veces.
- 5- Bloqueo de unión inespecífica
 - Sacudir y secar las laminillas, sin dañar el tejido y evitando que se seque.
 - Marcar el contorno del corte con un lápiz hidrofóbico.
 - Agregar unas gotas de PBS para enjuagar y colocar 50µL de albumina al 2% en cada corte.
 - Incubar de 20-60 minutos en cámara húmeda cerrada.
 - Enjuagar con PBS.
- 6- Incubación con anticuerpo primario
 - Sacudir y secar las laminillas, sin dañar el tejido y evitando que se seque.

- Agregar 50µL del anticuerpo para cada corte.
- Colocar en una cámara húmeda cerrada.
- Dejar reaccionar mínimo por 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°.
- Enjuagar con PBS.

7- Incubación con anticuerpo secundario

- Sacudir y secar las laminillas, sin dañar el tejido y evitando que se seque.
- Agregar 1 gota del anticuerpo marcado con biotina (Biotinylated link: frasco amarillo; kit Dako) por cada corte.

8- Incubación con estreptavidina-peroxidasa

- Sacudir y secar laminillas, sin dañar el tejido y evitando que se seque.
- Agregar 1 gota de estreptavidina (Streptavidin-HRP; frasco rojo; Kit Dako) por cada corte.
- Colocar en una cámara húmeda cerrada por 1 hora, a temperatura ambiente.
- Enjuagar con PBS.

9- Revelado con diaminobencidina (DAB)

- Preparar DAB (diaminobencidina; altamente carcinógena) en 1 mL de buffer de cromógeno (incluido en kit Dako).
- Agregar 50 µL de la solución por cada corte y esperar la aparición de un tono café claro en los cortes (máximo tiempo de reacción: 10 minutos).
- Enjuagar con PBS.

10- Contraintinción con hematoxilina de Harris

- Sumergir 3 minutos en hematoxilina de Harris previamente filtrada.
- Enjuagar con agua de llave, 3 veces.
- Sumergir las laminillas en los siguientes:
- Etanol de 96°, por 3 minutos, 2 veces.
- Etanol al 100%, 3 minutos, 2 veces.
- Etanol-Xilol (1:1), 3 minutos.
- Xilol por 10 minutos, 2 veces.

F) Análisis estadístico

ANOVA: ANOVA es el acrónimo de análisis de la varianza. Es una prueba estadística desarrollada para realizar simultáneamente la comparación de las medias de más de dos poblaciones (Hurtado y Silvente, 2012).

t de Student: La t de Student, se diseñó para examinar las diferencias entre dos muestras independientes y pequeñas que tengan distribución normal y homogeneidad en sus varianzas (Sánchez, 2015).

Método de Tukey: Se le conoce como método de la diferencia honestamente significativa, todas las comparaciones se refieren a una misma diferencia mínima, se utiliza un solo valor con el cual se comparan todos los posibles pares de medias. Numerosos autores coinciden en afirmar que la prueba es apropiada para realizar comparaciones por pares, por lo que tiene una gran aceptación (Cardoso y Veitía, 2008).

Método de Dunnett: Es una prueba para realizar comparaciones planeadas. Se utiliza para comparar cada grupo con un grupo control. Este procedimiento permite detectar todos los tratamientos que son tan buenos como el control o mejores que él (Cardoso y Veitía, 2008).

15. Literatura citada

1. Alba-de-Armas, M. Á., Bravo-Sánchez, L. R., Dumenigo-Peña, L., y Gómez-Reyes, I. (2015). Desarrollo y Validación de un método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la cuantificación de fitoesteroles en *Portulaca oleracea* L. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 46:1-6.
2. Allemang-Grand, R., Scholz, J., Ellegood, J., Cahill, L., Laliberté, C., Fraser, P., Josselyn, S., Sled, J. y Lerch, J. (2015). Altered brain development in an early-onset murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 638-647.
3. Álvarez Sánchez, M., Pedroso, I., de la Fe, A., Padrón Sánchez, A., Álvarez Sánchez, M. y Álvarez, L. (2008). Pathophysiology of Alzheimer's disease. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(3), 196-201.
4. Barrera-Catalán, E. y Herrera-Castro. (2015). Plantas medicinales del municipio de Tixtla de Guerrero, México. 38(1):109-111.
5. Bernhardt, R. (2005). Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Neuro-Psiquiat.* 43(2):123-132.

6. Bernhardt, R. (2007) La Neuroinflamación en la Patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer. Boletín Escuela Medica 32(1): 4-15.
7. Beyra, A., León, M., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimaraes, M. y Álvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). 61(2):185-204.
8. Cánovas, A, Luquin, R., García, P., Burguera, J., Campos V., Castro, A., Linazasoro, G., López, J., Vela, L. y Martínez, J. (2011). Agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson. Neurología. 29(4):230-241.
9. Cardoso, G. C. y Veitía, N. (2008). Aplicación de métodos de comparaciones múltiples en Biotecnología Vegetal. Biotecnología Vegetal, 8(2).
10. Cheng, L., Ren, Y., Lin, D., Peng, S. A., Zhong, B. y Ma, Z. (2017). The Anti-Inflammatory Properties of Citrus wilsonii Tanaka Extract in LPS-Induced RAW 264.7 and Primary Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. Molecules, 22(7), 1213.
11. Conde, C., Nieto, J. y Orozco, L. (2008). Análisis comportamental de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo dos horarios de alimentación. Salud UIS. 40(1): 83-91.
12. Coronas-Sámano, G., Medina-Aguirre, I., Aguilar, A., Portillo-Martínez, W., González-Luna, I., Paredes-Guerrero, R. y Díaz-Cintra, S. (2011). Revista Digital Universitaria. 12(3): 1-9.
13. Cruz Paredes, C., Bolívar Balbás, P., Gómez-Velasco, A., Juárez, Z. N., Sánchez Arreola, E., Hernández, L. R. y Bach, H. (2013). Antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Lopezia racemosa*. The Scientific World Journal. 2013:1-6
14. De Pipaón, I. S. y Larumbe, R. (2001). Programa de enfermedades neurodegenerativas. In Anales del Sistema Sanitario de Navarra (Vol. 24, pp. 49-76).
15. Fernández-Cuesta, A., Velasco, L. y Fernández-Martínez, J. M. (2011). phytosterols in the seeds of wild sunflower species/fitoesteroles en las semillas de especies silvestres de girasol. Helia, 34(55), 31-38.
16. Fiebich, BL, Heinrich, M., Hiller, KO, y Kammerer, N. (2001). La inhibición de la síntesis de TNF- α en estimuladas con LPS de monocitos humanos primarios por Harpagophytum extraer SteiHap 69. Phytomedicine. 8(1), 28-30.

17. Godýn, J., Jonczyk, J., Panek, D. y Malawska, B. (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports*. 68: 127-138.
18. Guha, M. y Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling*, 13(2), 85-94.
19. Herrera-Rivero, M., Hernández-Aguilar, M., Manzo, J. y Aranda-Abreu, G. (2010). Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico. *Revista Neurología*. 51(3): 153-164.
20. Hey-kyeong, J., Ilo, J. y Eun-hye, J. (2010). Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Molecular medicine*. 42(12): 823-832.
21. Hurtado, M. J. R. y Silvente, V. B. (2012). Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas t de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. *REIRE*, 5(2).
22. Instituto de Biología. *Lopezia racemosa*- IBUNAM:MEXU:OAX724172"., UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12. Universidad Nacional Autónoma de México. Consulta en: 2017-2-1. Disponible en:
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX724172>
23. Kim, B. W., Koppula, S., Kim, J. W., Lim, H. W., Hwang, J. W., Kim, I. S. y Choi, D. K. (2012). Modulation of LPS-stimulated neuroinflammation in BV-2 microglia by *Gastrodia elata*: 4-hydroxybenzyl alcohol is the bioactive candidate. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 549-557.
24. Kumar, A., Singh, A. y Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*. 67:195-203.
25. Li, N., Zhou, L., Li, W., Liu, Y., Wang, J. y He, P. (2015). Protective effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 on an Alzheimer's disease mouse model: A metabolomics study. *Journal of Chromatography B*, 985, 54-61.
26. Luquin, M., García-Ruíz, P., Martí, M., Rojo, A., Vela, L., Grandas, F., Bravo-Ultrera, M., Burguera, J., Chacón, J., Campos-Arillo, V., Durán-Herrera, C., Fernández-García, J., García-Ramos, R., Gómez-Esteban, J., Guitiérrez, J., Juni, J., Mata, M., Martínez-Castrillo, J., Olivares, J., Ribacoba-Montero, R., Santos-García, D., Sierra, M. y Valero-Merino, C. (2012). Levodopa en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mitos y realidades. *Neurobiología*. 55(11): 669-688.

27. Miguel-Vázquez, M., y Cerros-Tlatilpa, R. (2013). Onagraceae de Morelos, México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 84(4): 1309-1315.
28. Moreno-Anzures, N., Maquina, S., Alvarez, L., Zamilpa, A., Castillo-España, P., Perea-Arango, I., Nicasio, P., Herrera-Ruiz, M, Diaz, E., Tortoriello, J. y Arellano-García, J. 2017. A Cytotoxic and Anti-inflammatory Campesterol Derivative from Genetically Transformed Hairy Roots of *Lopezia racemosa* Cav. (Onagraceae). *Molecules*. 118(22): 1-12.
29. Nava, M. y Gevorkian, G. (2016). LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical Assessment of nutraceuticals. *Neuropharmacology*. 14:155-164.
30. Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J., Femenía, T., García-Gutiérrez, M., García-Payá, M., Leiva-Santana, C. y Manzanares, J. (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Neurofarmacología*. 47(3):137-145.
31. Nazem, A., Sankowski, R., Bacher, M. y Al-Abed, Y. (2015). Modelos de roedores de neuroinflamación para la enfermedad de Alzheimer. *Journal of neuroinflammation*. 12 (1), 74.
32. Nieto-Escamez, F. y Moreno-Montoya, M. (2011). Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo: implicaciones para el aprendizaje y la memoria en el cerebro. *Neurocién*. 16(4): 193-199.
33. Onos, K., Sukoff Rizzo, S., Howell, G. y Sasner, M. (2016). Toward more predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 122, 1-11.
34. O'Callaghan, P., Li, JP, Lannfelt, L., Lindahl, U. y Zhang, X. (2015). Los proteoglicanos de sulfato de heparan microglial facilitan la respuesta inflamatoria dependiente del receptor 4 (TLR4) del clúster de diferenciación 14 (CD14). *Journal of Biological Chemistry*, 290 (24), 14904-14914.
35. Olajide, OA, Bhatia, HS, de Oliveira, AC, Wright, CW, y Fiebich, BL (2013). Inhibición de la neuroinflamación en microglía activada por LPS por criptolepina. *Medicina Complementaria y Alternativa Basada en la Evidencia*. 1-10.
36. Park, J. W., Kwon, O. K., Yuniato, P., Marwoto, B., Lee, J., Oh, S. R. y Ahn, K. S. (2016). Amelioration of an LPS-induced inflammatory response using a methanolic extract of *Lagerstroemia ovalifolia* to suppress the activation of NF- κ B in RAW264.7 macrophages. *International journal of molecular medicine*, 38(2), 482-490.

37. Peñaherrera, E., Jerves Andrade, L., Cuzco, N., Wilches, I., León Tamariz, F. y Tobar, V. (2016). Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de peces cebras. 14: 1-12.
38. Pineda Rodríguez, M., García Delgado, B. y Hung Llamas, B. R. (2005). Fitosteroles y Patentes: Sus Aplicaciones en la Industria Farmacéutica. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 36.
39. Qun, H., Yang, T., Xiao, W., F, L., Wu, Y., Terrando, N. y Long, T. (2014). Prolonged Neuroinflammation after Lipopolysaccharide Exposure in Aged Rats. Plos one. 9(8): 1-9.
40. Qin, L., Wu, X., Block, ML, Liu, Y., Breese, GR, Hong, JS. y Crews, FT. (2007). El LPS sistémico causa neuroinflamación crónica y neurodegeneración progresiva. Glía. 55 (5), 453-462.
41. Reynaldo, G., Pardo, G., Guevara, M., Cascudo, N. y Rosa, M. (2008). Teorías acerca de los mecanismos celulares y moleculares en la enfermedad de Alzheimer. Revista Cubana de Medicina. 47(3):1-12.
42. Rodríguez-Agudelo, Y., Mondragón-Maya, A., Paz-Rodríguez, F., Chávez-Oliveros, M., y Solís-Vivanco, R. (2010). Variables asociadas con ansiedad y depresión en cuidadores de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Archivos de Neurociencias, 15(1), 25-30.
43. Sabogal-Guáqueta, A., Muñoz-Manco, J., Ramírez-Pineda, J., Lamprea-Rodríguez, M., Osorio, E. y Cardona-Gómez, G. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. Neuropharmacology, 93, 134-145.
44. Salinas, R., Arellano-García, J., Perea-Arango, I., Álvarez, L., Garduño-Ramírez, M. y Marquina, S. (2014). Production of the Anti-Inflammatory Compound 6-O-Palmitoyl-3-O- β -D-glucopyranosylcampesterol by Callus Cultures of *Lopezia racemosa* Cav. (Onagraceae). Molecules, 19(6), 8679-8690.
45. Sánchez Turcios, R. A. (2015). t-Student: Usos y abusos. Revista mexicana de cardiología, 26(1), 59-61.
46. Sandoval-Avila, S., Diaz, N. F., Gómez-Pinedo, U., Canales-Aguirre, A. A., Gutiérrez-Mercado, Y. K., Padilla-Camberos, E. y Díaz-Martínez, N. E. (2016). Efecto neuroprotector de fitoquímicos en cultivo de neuronas dopaminérgicas. Neurología. 1-11.

47. Sarasa, M. (2006). Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología*. 42(5):297-301.
48. Segura, T., Galindo, M. F., Rallo-Gutiérrez, B., Ceña, V. y Jordán, J. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol*, 36(11), 1047-1057.
49. Spulber, S., Edoff, K., Hong, L., Morisawa, S., Shirahata, S. y Ceccatelli, S. (2012). Molecular hydrogen reduces LPS-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. *PLoS one*, 7(7), 42078.
50. Vicens, P., Redolat, R. y Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*. 15(4).
51. Vorhess, C. y Williams, M. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Institutes Health of National*. 1(2): 848-858.
52. Woong, J., Kyung, Y., Yeon, D., Young, D., Bae, S., Wan, K. y Tae, J. (2008). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Neuroinflammation*. 5(37):1-14.
53. Xinhua, M., Stamova, P., Lee-Way, M., M., Charles, M., Phinney, P. y Frank, M. (2016). Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*. 87: 2324-2332.
54. Xing, B., Bachstetter, A. D. y Van Eldik, L. (2011). Microglial p38 α MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration, through a mechanism involving TNF α . *Molecular neurodegeneration*, 6(1), 84.
55. Ye, M., Moon, J., Yang, J., Hwa Lim, H., Bin Hong, S., Shim, I. y Bae, H. (2015). The standardized *Lycium chinense* fruit extract protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 85-90.
56. Zhou, W., Lu, S., Su, Y., Xue, D., Yu, X., Wang, S. Zhang, H., Xu, P., Xie, X. y Liu, R. (2014). Decreasing oxidative stress and neuroinflammation with a multifunctional peptide rescues memory deficits in mice with Alzheimer disease. *Free Radical Biology And Medicine*, 74, 50-63.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 06/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Co Tutor)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Susana Valencia Díaz

Tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL
EXTRACTO DICLOROMETANO-METANOL DE *Lopezia racemosa* EN UN
MODELO MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS "

Alumno que la presenta a revisión: **WILVER MONTES DORANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 03/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Co Tutor)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Susana Valencia Díaz

Tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL
EXTRACTO DICLOROMETANO-METANOL DE *Lopezia racemosa* EN UN
MODELO MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS"

Alumno que la presenta a revisión: **WILVER MONTES DORANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 08/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Co Tutor)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Susana Valencia Díaz

Tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL
EXTRACTO DICLOROMETANO-METANOL DE *Lopezia racemosa* EN UN
MODELO MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS"

Alumno que la presenta a revisión: **WILVER MONTES DORANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 03/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Co Tutor)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Susana Valencia Díaz

Tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL
EXTRACTO DICLOROMETANO-METANOL DE *Lopezia racemosa* EN UN
MODELO MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS"

Alumno que la presenta a revisión: **WILVER MONTES DORANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 03/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor principal)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Co Tutor)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Susana Valencia Díaz

Tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL
EXTRACTO DICLOROMETANO-METANOL DE *Lopezia racemosa* EN UN
MODELO MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS"

Alumno que la presenta a revisión: **WILVER MONTES DORANTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. SUSANA VALENCIA DIAZ

