



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS

**“Evaluación de las actividades
antiinflamatoria y antioxidante de
escamonina I y compuestos aromáticos
aislados de *Ipomoea tyrianthina*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Biól. Johanna Stefan Jaimes Acuña

Director: Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez Villafuerte

CUERNAVACA, MORELOS

Enero del 2019.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | 1 |
| I.INTRODUCCIÓN | 2 |
| I.II. SISTEMA NERVIOSO | 3 |
| I.III MICROGLÍA | 4 |
| <i>Inflamación</i> | 5 |
| <i>Mediadores inflamatorios</i> | 6 |
| <i>Interacciones Neurona-Microglía</i> | 8 |
| I.IV FAMILIA CONVULVACEAE | 12 |
| I.V GÉNERO <i>IPOMOEA</i> | 12 |
| <i>Resinas Glicosídicas</i> | 16 |
| <i>Ipomoea tyrianthina</i> | 17 |
| II. ANTECEDENTES | 184 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 228 |
| IV. HIPÓTESIS | 23 |
| V. OBJETIVOS | 23 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| <i>Modelo experimental</i> | 24 |
| <i>Compuesto Escamonina I</i> | 24 |
| <i>Ensayos de liberación de mediadores pro-inflamatorios</i> | 24 |
| <i>Ensayo inmunohistoquímico</i> | 27 |
| <i>Determinación del estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica ¡Error!</i> <i>Marcador no definido.</i> | |
| <i>Análisis estadístico</i> | 293 |
| REFERENCIAS | 454 |

RESUMEN

Desde épocas prehispánicas se han utilizado plantas medicinales en México; aprovechando su gran diversidad vegetal y su amplia riqueza cultural. Su uso ha promovido el estudio de metabolitos secundarios para el desarrollo de nuevos tratamientos fitoterapéuticos; aumentando el interés en éstos últimos, debido al aumento en el costo de los medicamentos sintéticos y sus efectos adversos a la salud. Existen diversos estudios en los cuales se han probado compuestos derivados de hojas, flores, tallos, raíces o frutos de plantas de diversos géneros que presentan alguna propiedad farmacológica, para mitigar enfermedades como cáncer, hiperglucemia, isquemia, reumatismo, dolores de cabeza, inflamación, resfriados, indigestión, diarrea, enfermedades cerebrovasculares, pérdida de memoria, etc. (Sook-Chun *et al.*, 2008; Sheeja Malar *et al.*, 2016; Yong-Jian *et al.*, 2010).

Algunos estudios han reportado que especies del género *Ipomoea* presentan gran cantidad de metabolitos secundarios, los cuales han sido ampliamente evaluados, observando que tienen efecto sobre el Sistema Nervioso, ya que sirven como sedativos, anticonvulsivos y se ha observado que disminuyen la activación de las células gliales. Por lo cual en el presente estudio se pretende determinar la actividad de dos compuestos aislados de la glicoresina de *Ipomoea tyrianthina* evaluando su efecto contra la inflamación, estableciendo su actividad frente a la activación de las células gliales, la liberación de mediadores pro-inflamatorios y sobre el estrés oxidativo. Además, se pretende determinar la actividad antioxidante de los compuestos para observar el grado de neuroprotección que puede brindar frente a la inflamación inducida por lipopolisacáridos.

I. INTRODUCCIÓN

La evaluación de extractos aislados de plantas ha permitido observar metabolitos secundarios, que presentan actividad antioxidante y/o antiinflamatoria, permitiendo la protección contra daños neurodegenerativos frente a estrés oxidativo, ansiedad y convulsiones, signos de enfermedades del Sistema Nervioso como Epilepsia, Alzheimer, Parkinson, Esclerosis múltiple y Huntington. El énfasis en el estudio del desarrollo de estas enfermedades ha aumentado ya que actualmente se consideran un problema de salud pública a nivel mundial, debido a las consecuencias que se presentan por la pérdida progresiva de neuronas y la consiguiente alteración de las funciones motora, sensorial y cognitiva. (González-Burgos *et al.*, 2014; Nillert *et al.*, 2017; Sheeja Malar *et al.*, 2016; Twinomujuni *et al.*, 2016; Yong-Jian *et al.*, 2010).

La neuroinflamación es una característica común en diversas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) y en estados de daño por isquemia; y esta mediada por la activación de las células gliales, principalmente de la microglia. Existen diversos modelos en animales que permiten estudiar la activación de la microglia, utilizando agentes inflamatorios como lipopolisacáridos, interferón gamma (IFN γ) o por β -amiloide, en los cuales se puede observar la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias. Debido a la importancia que presenta la inflamación en el daño y muerte neuronal, se han realizado investigaciones para determinar los mecanismos de inflamación, así como la evaluación de nuevos compuestos para el desarrollo de tratamientos que tengan menos efectos adversos y que presenten actividad con una dosis menor, evitando de esta manera la codependencia a medicamentos sintéticos. Por lo que actualmente los compuestos aislados de plantas son una alternativa importante, debido a que se ha demostrado que presentan actividad antiinflamatoria, por su capacidad de inhibir la liberación de COX-2, INOS así como evitar la producción de citocinas, permitiendo de esta manera estudiar nuevas estrategias prometedoras para el desarrollo de nuevos medicamentos cuyos mecanismos de acción estén dirigidos a inhibir la activación de la microglia.

I.II. Sistema Nervioso

El sistema nervioso recibe la información del entorno a través de receptores sensitivos y la transmite al encéfalo o a la médula espinal, en donde la información sensitiva es procesada e integrada para iniciar la respuesta adecuada. Se divide en Sistema Nervioso Central (SNC; encéfalo y médula espinal) y Periférico (SNP; nervios que conectan al encéfalo y la médula espinal con estructuras periféricas), en el cual existen dos clases principales de células:

Neurona: células especializadas en recibir información, transmitir impulsos e influir en otras neuronas o tejidos efectores. Está limitada por una membrana plasmática continua y consta de un soma o cuerpo neuronal (centro metabólico) del que nacen ramificaciones denominadas dendritas, estas se encargan de recibir señales de otras neuronas o del entorno. Sin embargo, existe otra prolongación denominada axón de mayor longitud la cual transmite los impulsos a destinos más alejados (Haines, 2003).

Células gliales: proporcionan a las neuronas soporte estructural y mantienen un microambiente adecuado, esencial para la función neuronal, suponen el mayor número de células del sistema nervioso, los tipos fundamentales de las células gliales son:

- **Astroцитos:** se encargan del mantenimiento del entorno iónico extracelular, secretan factores de crecimiento, son apoyo estructural y metabólico para las neuronas. Se encuentran por todo el sistema nervioso en contacto con somas, dendritas y axones formando un revestimiento completo en las superficies externas del SNC y alrededor de vasos sanguíneos; los astroцитos de la sustancia gris se denominan protoplásmicos y los de la sustancia blanca fibrosos (Haines, 2003).
- **Oligodendrocitos:** su única función es la mielinización, que consiste en la creación de una vaina que rodea a los axones para aislarlos electroquímicamente (Haines, 2003).
- **Microglía:** son las células inmunitarias efectoras del SNC y el tipo celular más importante de cuantos intervienen en la inflamación. Al igual que los macrófagos tienen la capacidad de convertirse en fagocitos, en condiciones de daño o lesión migran a la zona dañada donde proliferan y fagocitan los residuos celulares (Haines, 2003).

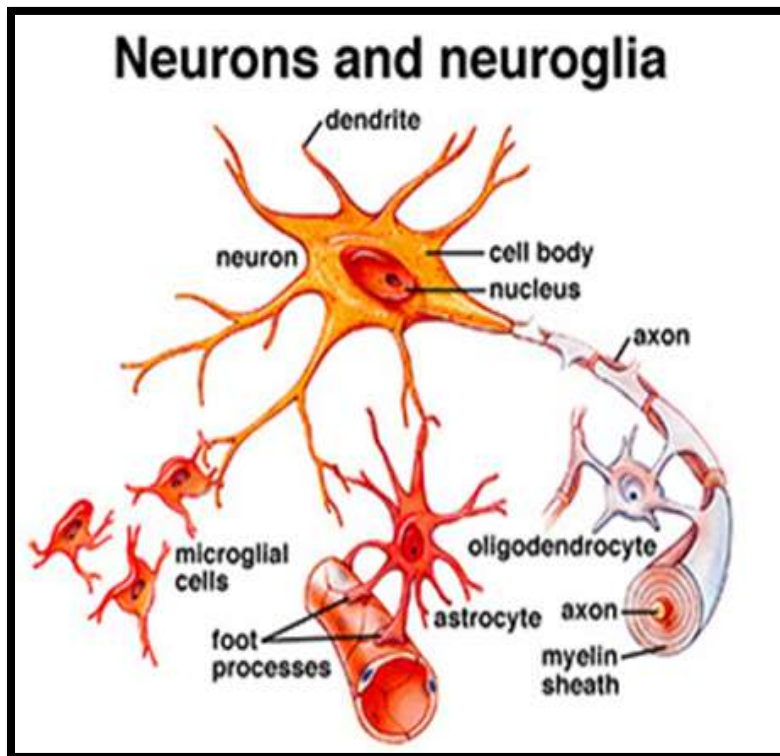


Figura 1. Células del Sistema Nervioso Central (<http://www.keywordsking.com>)

I.III Microglía

Estas células constituyen aproximadamente el 5-15% de la población del Sistema Nervioso Central, están involucradas en la respuesta inmune, las cuales son activadas en situaciones de estrés. Estudios realizados actualmente indican que son necesarias para la neuroplasticidad adaptativa, el comportamiento y están encargadas de dirigir funciones homeostáticas modulando las respuestas inmunes, reparativas y de crecimiento, además, en su forma activa se puede observar la liberación de factores neurotóxicos como: óxido nítrico, prostaglandinas, citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , factor α de necrosis tumoral o TNF- α , etc.) y especies reactivas de oxígeno (ROS) promoviendo de esta manera el proceso neurodegenerativo que puede conducir al daño neuronal y muerte. Las respuestas a daño están mediadas por la liberación neuronal de nucleótidos (UDP, ATP) y neurotransmisores (glutamato, GABA y norepinefrina) provocando la activación de los microglíocitos los cuales migran hacia las zonas afectadas y en algunos casos pueden sufrir cambios morfológicos presentándose en forma ameboides (Cuenca-López *et al.*, 2010; Kettenmann, 2011; Salemme *et al.*, 2016; Wohleb, 2016).

Inflamación

La inflamación es la respuesta inicial, rápida e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos controlada humoral y celularmente; en la cual se puede observar vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación/adhesión celular e hipercoagulación. La vasodilatación y el incremento de la permeabilidad microvascular en el lugar de la inflamación aumentan la disponibilidad local de nutrientes y de oxígeno, produciendo calor, hinchazón y edema tisular (Cuenca-López *et al.*, 2010; García de Lorenzo *et al.*, 2000; Reséndiz-Hernández *et al.*, 2011; Wohleb, 2016).

La respuesta inflamatoria en el SNC se caracteriza por la activación de la microglía y astrocitos, los cuales permiten la expresión de mediadores inflamatorios clave (citocinas, quimiocinas y prostanglandinas). Actualmente se han realizado diversos estudios para contrarrestar estos cambios en el cerebro y de esta forma evitar un daño neuronal secundario. Diversos estudios en animales han evaluado agentes tóxicos inductores de la neuroinflamación como son los lipopolisacáridos, β -amieloide, ácido kaínico, etc. tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*, los lipopolisacáridos (LPS) son utilizados para estimular la activación microglial y de esta manera evaluar su mecanismo de acción frente a los efectos producidos en la inflamación, lo que ha llevado a determinar que al inhibir la activación de las células gliales frente a estímulos de daño en el cerebro, se podría prevenir la neurodegeneración la cual es un factor principal de diferentes enfermedades (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016; Yuan *et al.* 2016).

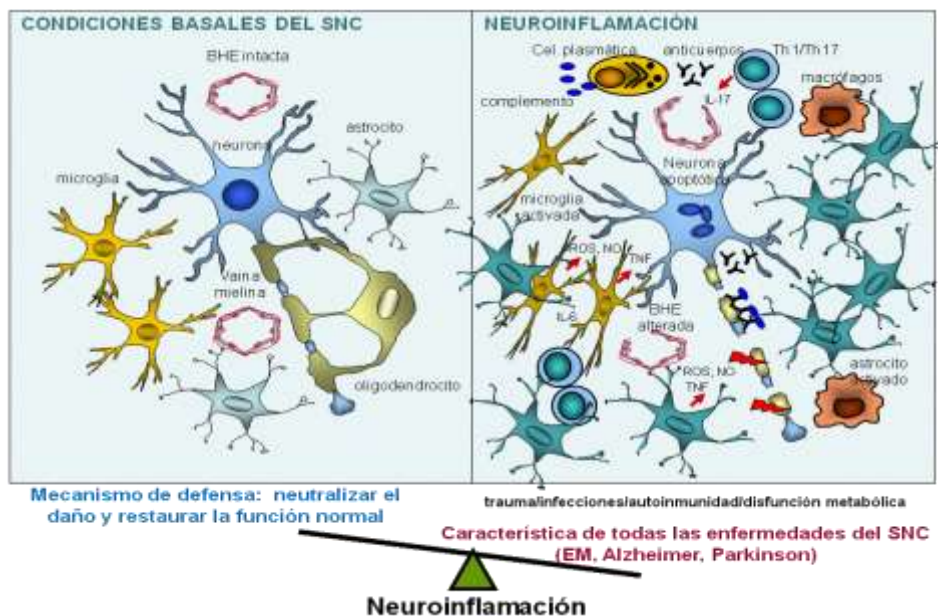


Figura 2. Neuroinflamación

(<http://www.ipb.csic.es/departamentos/Dpto.deBiologiaCelulareInmunologia>)

Mediadores inflamatorios

Citocinas

Engloban más de 100 péptidos genética y estructuralmente diferentes que actúan uniéndose a receptores específicos sobre la superficie celular. Se agrupan en cuatro grupos funcionales de acuerdo con el sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúen, por ejemplo las citocinas pro-inflamatorias actúan en la respuesta inmune innata e inespecífica, así como en la inflamación. Las principales citocinas que actúan en el proceso de inflamación son: interleucinas (IL) IL-1, IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) todas ellas pro-inflamatorias. Sin embargo, existen citocinas con actividad anti-inflamatoria como la IL-10 (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

IL1: se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o ante cualquier tipo de lesión o estrés, siendo liberada en respuesta al TNF- α . Presenta tres isoformas: IL-1 α , IL-1 β las cuales se liberan principalmente en procesos neurotóxicos inducidos por agentes como: cainato, lipopolisacáridos, etc. y después de un proceso isquémico. La isoforma IL-1RA es inhibitoria ya que impide la unión de las dos anteriores a sus receptores. El precursor de la IL-1 α presenta actividad, mientras que el de IL-1 β es inactivo y requiere ser activado por la acción de la proteasa caspasa. (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

IL-6: es una glucoproteína segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α . Se encarga de activar la formación de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B y está implicada en la regulación de la apoptosis neuronal (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α): sustancia química liberada por células del sistema inmune cerebral, su regulación es proporcional a la expresión de IL-1 e IL-6. Constituye el principal mediador de inflamación induciendo una cascada de eventos celulares que culminan con la muerte neuronal (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

Quimiocinas

Son una familia creciente de citocinas de menor peso molecular, que regulan la actividad de la microglía, el tráfico leucocitario, la quimiotaxis, afectan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permiten la migración celular, además de encargarse de la activación y reclutamiento de células que permitan el desarrollo de la inflamación. Se ha demostrado que varias quimiocinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), la fractalcina, la IL-8 y la proteína inflamatoria de macrófagos 1α aumentan en diversos modelos experimentales de isquemia.

La fractalcina es expresada principalmente por las neuronas y regula la activación de la microglía a través de la unión a un receptor acoplado a proteína G, denominado CX3CR1 neuronal (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

Ciclooxigenasa (COX)

La COX o prostaglandina-endoperóxido sintasa es un enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas:

COX-1: se expresa en varios tipos celulares incluyendo la microglía y los leucocitos durante el daño cerebral neuronal (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

COX-2: se expresa en neuronas excitatorias y en la mayoría de órganos, siendo regulada por estímulos causados por los mediadores inflamatorios o mitógenos. Estudios han demostrado que COX-2 se asocia con la producción de radicales libres y prostanoides tóxicos (Cuenca-López *et al.*, 2010; Wohleb, 2016).

Se ha demostrado que la microglía sometida a estrés continuo experimenta alteraciones en su función y morfología, esto debido a la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) los cuales promueven la señalización (ATP, HMGB1, CX3CL1, vías noradrenérgicas) para activar la neuroinflamación a través del inflasoma NLRP3, dando como resultado actividad aberrante en las neuronas y alteración de la neuroplasticidad (Wohleb, 2016).

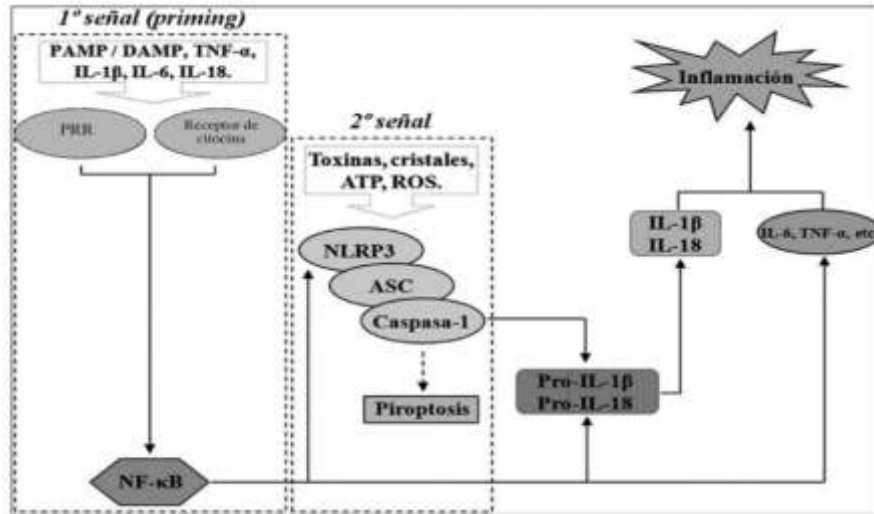


Figura 3. Activación del inflasoma NLRP3 proceso que da origen a las formas biológicamente activas de IL-1β e IL-18.

Interacciones Neurona-Microglía

La neurona regula la función y morfología de la microglía a través de factores solubles (quimiocinas, citosinas y neurotransmisores) y mecanismos dependientes de contacto (comunicación recíproca), estas interacciones tienen un papel integral en la homeostasis, ya que estudios han reportado que perturbaciones en esta interacción conduce a una neuroplasticidad dañada, además de influir en deficiencias en la memoria (Wohleb, 2016).

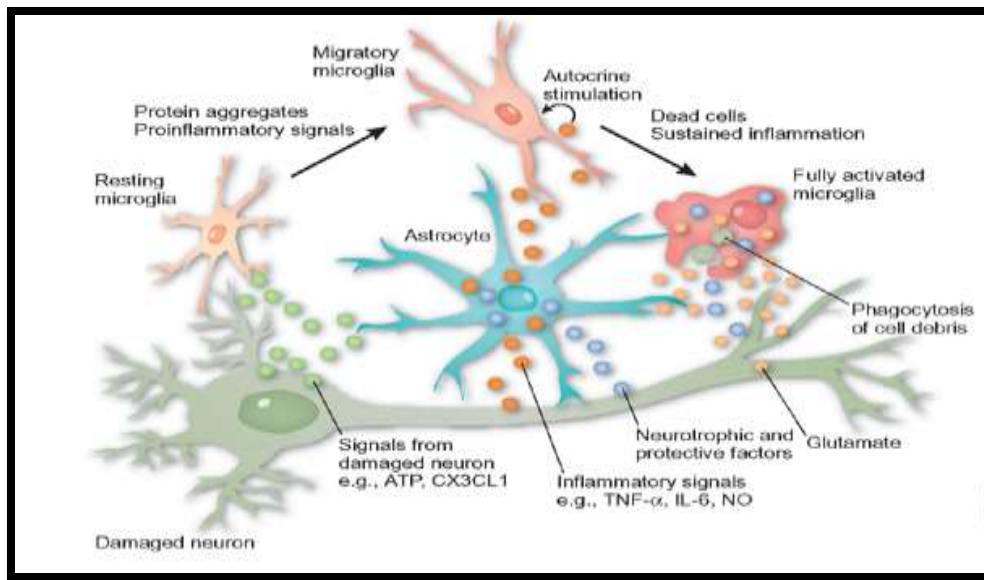


Figura 4. Activación de microglía (<https://www.researchgate.net/Figure-1-Microglia-respond-signals>).

Estrés oxidativo

Se le denomina estrés oxidativo al desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)/nitrógeno (RNS) y la capacidad del organismo para contrarrestar su acción por sistemas antioxidantes, diversos estudios sugieren que la sobreproducción de estas especies reactivas están asociadas con diversas enfermedades crónicas como cáncer, cardiovasculares (ateroesclerosis), neurodegeneración y envejecimiento. Bajo condiciones fisiológicas normales los radicales libres son generados en procesos aeróbicos como es el caso de la respiración celular, en la activación de fagocitos, durante actividad física intensa y por la acción de contaminantes o toxinas como humo de cigarro, alcohol, radiación UV, pesticidas y ozono. Sin embargo ROS en bajas concentraciones representan moléculas de señalización que están involucradas en la regulación de la proliferación celular, apoptosis, expresión de genes y en la defensa contra cepas de hongos y bacterias. Las altas concentraciones de especies reactivas lleva a la oxidación de biomoléculas, como es el caso de los lípidos (daño membranas celulares), proteínas (inactivación) y ADN (mutaciones) (Pisoschi 2015).

Características de las especies reactivas:

Peróxido de hidrogeno (H_2O_2): síntesis directa por algunas enzimas oxidasas (urato oxidasa, glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa). La acción directa de H_2O_2 involucra el ataque de proteínas haem, la inactivación de enzimas y la oxidación de DNA, lípidos, grupos $-SH$. Es eliminado por la catalasa convirtiéndolo en H_2O .

Superoxido ($O_2^{\cdot-}$): es resultado de la reducción de un electrón del oxígeno por varias oxidasas (xantina oxidasa, ciclooxigenasa, etc.), también puede ser formado en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Puede dismutarse produciendo oxígeno molecular y peróxido de hidrogeno por enzimas de la familia superóxido dismutasa

Oxígeno molecular (singlet) ($1/2 O_2$): no es un radical libre es considerado una especie oxigenada con alta reactividad.

Radical hidroxilo ($\cdot OH$): ha sido reportado como el radical con mayor poder oxidable que puede interactuar con moléculas orgánicas e inorgánicas (DNA, proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares y metales)

Óxido nítrico endógeno es biosintetizado por L-arginina, oxígeno, NADPH, por enzimas pertenecientes a la clase óxido nítrico sintasa o por la reducción de nitrato inorgánico, está involucrado en la vasodilatación y neurotransmisión, es también liberado por fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos) como resultado de la reacción del sistema inmune. Puede alterar la estructura de la hemoglobina, ruptura de las cadenas DNA, oxidación de proteínas. Puede reaccionar con el radical anión superóxido, produciendo la especie de nitrógeno más reactiva y causante de mayor daño a la mayoría de las biomoléculas llamado peroxinitrato ($ONOOH$).

Especies reactivas de oxígeno y su daño a biomoléculas:

Lípidos: daño en las membranas celulares, los más susceptibles a la oxidación (ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico los cuales liberan aldehídos reactivos malondialdehído y 4-hidroxinonenal, reconocidos como marcadores de la oxidación de lípidos, estos a su vez pueden atacar a proteínas y perjudicar su función.

Ácidos nucleicos: romper las cadenas y alteraciones en las estructuras de las bases purinas y pirimidinas, llevando a las mutaciones DNA, todos los aminoácidos son susceptibles a la oxidación principalmente la cisteína y metionina, la mayoría de estas oxidaciones son reversibles gracias a la actividad de las reductasas disulfuro

Proteínas: afectar oxidación de la cadena lateral resultando en la pérdida de la actividad

Las fuentes endógenas responsables de especies oxidantes han sido identificadas en la mitocondria (cadena transportadora de electrones) y en las reacciones de catalizador de la óxido nítrico sintasa, fuentes no mitocondriales son en la reacción fenton, complejo enzimático microsomal, citocromo P450, beta-oxidación peroxisomal y activación de las células fagocíticas.

Antioxidantes

El concepto biológico de un antioxidante se refiere a cualquier compuesto presente a bajas concentraciones (comparado con el agente oxidante) capaz de retrasar o evitar la oxidación de un sustrato. Existen dos tipos de antioxidantes aquellos que previenen la aparición de especies reactivas y aquellos que bloquean o capturan los radicales formados (Pisoschi 2015).

En las células la homeostasis Redox se mantiene por un sistema de defensa antioxidante endógeno el cual incluye la activación de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Además existen compuestos no enzimáticos que ayudan a mantener el equilibrio en las células como es el caso del glutatión, ferritina, ácido úrico, coenzima Q y ácido lipoico. Sin embargo se ha confirmado la presencia de antioxidantes exógenos como es el caso de los carotenoides, fenoles, la vitamina C y E presentes en frutas y verduras (Pisoschi 2015). Sin embargo otro sistema antioxidante importante de las células es representado por los procesos de reparación que eliminan las biomoléculas dañadas antes de que su agregación permita alteraciones en el metabolismo celular, este consiste en la reparación de los ácidos nucleicos por enzimas específicas, eliminación de proteínas oxidadas por sistemas proteolíticos y reparación de lípidos por fosfolipasas, peroxidases o aciltransferasas. Otra clasificación de los antioxidantes es de acuerdo a su solubilidad: soluble en agua

(flavonoides, ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión) y liposolubles (carotenoides, tocoferoles, ascorbil palmitato/estearato)

Los suplementos de antioxidantes pueden reducir el incremento de los niveles del estrés oxidativo que no puede ser inactivado por las fuentes endógenas, con la edad en donde las fuentes endógenas y los sistemas de reparación no lo pueden contrarrestar eficientemente. En la industria el término antioxidante se refiere a un compuesto que previene la degradación oxidativa del caucho y plásticos. En la ciencia alimentaria para preservar los alimentos contra la ranciedad

Antioxidantes endógenos:

Superoxido dismutasa

Transforma el radical anión superóxido \rightarrow H_2O_2 . Existen tres tipos descritos en los tejidos de mamíferos, SOD1: presente en el citosol, SOD2, en la matriz mitocondrial y SOD3, extracelular

Catalasa $H_2O_2 \rightarrow H_2O$, es expresada en la mayoría de las células, órganos y tejidos, sin embargo se pueden encontrar concentraciones elevadas en el hígado y eritrocitos.

Glutatión peroxidasa: reduce H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos a agua o alcoholes correspondientes,

Glutatión: reconocido como antioxidante o citoprotector, puede capturar peróxido de hidrógeno, anión hidroxil y oxidantes clorinados, se encuentra en niveles de 5-10 mM en la mayoría de los tejidos.

Ácido úrico presenta la capacidad de capturar radicales reactivos resultantes de procesos nocivos como es la autooxidación de la hemoglobina o la generación de peróxidos por los macrófagos, presenta una eficiente actividad contra oxígeno molecular, radicales peróxido e hidroxil y protege las membranas de los eritrocitos de la peroxidación lipídica, se encuentran mayores concentraciones en la barrera hematoencefálica

Melatonina: se ha reportado su capacidad de contrarrestar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (radical hidroxilo, radical anión superóxido y óxido nítrico) y es un excelente protector contra el estrés oxidativo mitocondrial. Existen metabolitos de melatonina AFMK (N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxiquinuramina) y AMK (N1-cetil-5-metoxiquinuramina) los cuales disminuyen las actividades y expresión de enzimas pro-oxidantes (óxido nítrico sintasa) y pro-inflamatorias (ciclooxigenasa2)

Antioxidantes exógenos:

Ácido ascórbico: es el mejor antioxidante hidrosoluble dotado con una gran actividad, se oxida fácilmente a ácido dehidroascórbico. el L-enantiómero del ácido ascórbico (Vitamina C) está involucrado en el mantenimiento vascular y en la

integridad del tejido conectivo, en la absorción del hierro, en la biosíntesis del colágeno, neuroprotección, hematopoyesis y en el funcionamiento de leucocitos.

La vitamina C cumple un rol esencial en el cerebro siendo cofactor de dopamina beta-hidroxilasa y formando parte de la biosíntesis de catecolamina, protege los fosfolípidos de membrana del daño oxidativo y se ha demostrado como un eficiente captador de radicales libres (hidroxil, alcoxil y superóxido) en el cerebro, es el primer antioxidante eficiente en plasma

Vitamina E (alfa-tocoferol): pelea contra la peroxidación lipídica, ayuda en la preservación de las membranas

I.IV Familia Convolvulaceae

La familia Convolvulaceae pertenece al grupo de las angiospermas, comprende alrededor de 55 géneros, dentro de los cuales se enlistan aproximadamente 1650 especies en el mundo, son plantas leñosas o herbáceas rastreras o erectas, en ocasiones parásitas de otros vegetales. A menudo tienen hojas en forma de corazón y flores infundibuliformes con colores brillantes, sin embargo, una de las características más notable de esta familia es la existencia de células en su tejido foliar o en sus raíces que pueden secretar resinas glicosídicas (Carranza, 2007; Castañeda-Gómez *et al.*, 2013; Meira *et al.*, 2012).

I.V Género Ipomoea

El género *Ipomoea* se distribuye principalmente en los países tropicales de África, así como en América central hasta el sur del continente, con aproximadamente 500-600 especies, comprende el mayor número de especies dentro de las Convolvulaceae. Presenta diferentes usos principalmente con fines nutricionales (*I. batatas*, *I. aquatica*, etc.), religiosos (*I. alba*, *I. purpurea*, etc.), agrícolas y medicinales debido a sus actividades antimicrobianas, analgésicas, espasmolíticas, espasmogénicas, hipotensoras, anticancerígenas, además debido al contenido de alcaloides que presentan se ha utilizado como alucinógeno. México contiene un gran número de especies con importancia ornamental (*I. murucoides* contra mosquitos), medicinal (*I. stans* tratamiento para convulsiones epilépticas), nutricional y agrícola ya que *I. tricolor* tiene como propiedad la fitotoxicidad, evitando el crecimiento de malezas invasoras en cultivos (León-Rivera *et al.*, 2011; Meira *et al.*, 2012).

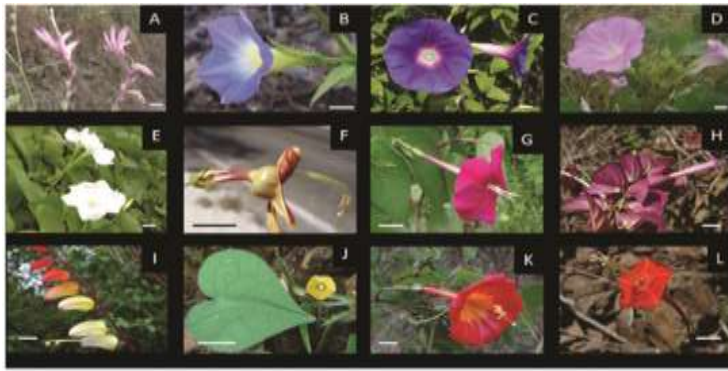


Figura 5. Diversidad floral de especies del género *Ipomoea* (Alcántar-Mejía *et al.*, 2012).

| Especies | Usos tradicionales |
|-----------------------|--|
| <i>I. aquatica</i> | Tratamiento de diabetes, antídoto para el veneno del escorpión, diurético, purgante, para tratar debilidad, leucoderma, lepra, fiebre. |
| <i>I. batatas</i> | Tratamiento de tumores de boca y garganta. La decocción de las hojas es usada como afrodisiacas, astringentes, bactericidas, fungicidas. |
| <i>I. digitata</i> | La raíz en polvo se usa como tónico, afrodisiaco, para la producción de leche materna y facilitar la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar. Decocción de la raíz contra el estreñimiento. |
| <i>I. muricata</i> | Tratamiento de enfermedades de la piel como heridas graves, gangrenosas, cortaduras o ampollas debido a quemaduras. Para el tratamiento de la faringitis. |
| <i>I. pes-caprae</i> | Tratamiento para inflamación. Las hojas (calientes) se usan para heridas, infecciones de la piel, ampollas y picaduras venenosas. |
| <i>I. asarifolia</i> | Contra la picazón. |
| <i>I. cairica</i> | Tratamiento del reumatismo y para inflamaciones. |
| <i>I. campanulata</i> | Antídoto contra el veneno de serpiente. |
| <i>I. carnea</i> | Contra el síndrome de inmunodeficiencia y para tratar la hipertensión. |
| <i>I. indica</i> | Purgante y para huesos rotos. |
| <i>I. murucoides</i> | Infusión de hojas, corteza y flores para tratar inflamaciones y picaduras de escorpión. |
| <i>I. orizabensis</i> | Como purgante y para tratar la fiebre abdominal, epilepsia, hidrocefalia, meningitis y tumores. |
| <i>I. purpurea</i> | Las infusiones son usadas como diuréticos, para detener hemorragias, purgativo y para el tratamiento de sífilis. |
| <i>I. stans</i> | Para inflamación del riñón, enfermedades de los ojos, parálisis, purgante, como agente antiespasmódico y sedativo. |
| <i>I. stolonifera</i> | Como diurético, para tratar el dolor después del parto, problemas estomacales, hinchazón y heridas. |

Tabla 1. Usos tradicionales de algunas especies de *Ipomoea* (Meira *et al.*, 2012)

La fitoquímica del género *Ipomoea* se ha estudiado desde 1950, los constituyentes biológicos activos más comunes de estas plantas son alcaloides (nortropeno, ergolina e indolicidina), compuestos fenólicos, cumarinas, norisoprenoides, diterpenos, isocumarinas, bencenoides, flavonoides, antocianósidos, glicolípidos, lignano y triterpenos. En los últimos años el interés científico en estas plantas aumento considerablemente, realizando reportes de sus propiedades químicas y farmacológicas. A pesar de esta gran cantidad de trabajos realizados aún existe un campo amplio de investigación futura en plantas parcialmente estudiadas (*I. operculata*, *I. parasítica*, *I. involucreta*, *I. hederácea*, *I. bahiensis*) para la identificación de aislados bioactivos nuevos, así como la comprensión de su estructura-actividad (Meira *et al.*, 2012).

| Alcaloides (Ergolina) | |
|--|--|
| Sustancia | Actividad |
| Agroclavina | Antimicrobiano y Citostático |
| Hanoclavina | Psicotrópico y Psicotomimético |
| Ergometrina ó Ergonovina | Psicotrópico, Psicotomimético, Vasoconstrictor, Hemostático y Uterotónico |
| Alcaloides (Indolicidina) | |
| Ipalbidina | Analgésico y Antioxidante |
| 2- <i>epi</i> -lentiginosina | Inhibidor de la actividad de alfa-manosidasa en rata |
| Swainsonina | Potente inmunomodulador antimetastático Inhibidor de la actividad de alfa-manosidasa en rata |
| Compuestos fenólicos | |
| N-cis-feruloil-tiramina N-trans-feruloil-tiramina | Inhibidor de la síntesis de prostaglandinas |
| Ácido cafeico | Antioxidante y Antimutagénico |
| Ácido clorogénico | Hipoglucémico, Antimutagénico, Antioxidante e inhibidor de la replicación del VIH |
| Cumarinas | |
| Cumarina | Citotóxico e Inmunoestimulante |
| Escopoletina | Hepatoprotector , Espasmolítico, Inhibición de la proliferación del cáncer de próstata, Anticoagulante, Anti-VIH, Antioxidante e Inhibidor de la acetilcolinesterasa |
| Umbeliferona | Anticoagulante y Anti-VIH |
| Norisoprenoides, Diterpenos, Isocumarinas y Bencenoides | |
| Actinidol | Inhibidor del edema de la oreja de rata inducido por fenilpropilato de etilo |
| Trans-beta-damascenona | Antiespasmódico |
| 4-vil-guayacol | Inhibición de la síntesis de prostaglandinas |
| Triterpenos | |
| Acetato de beta-amirina | Antinociceptivo |
| Acetato de boehmerilo | Estimulante de la ovoposición de <i>Cylas formicarius elegantulus</i> |
| Friedelina | Antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudallescheria boydii</i> |

| Glicolípidos | |
|-----------------|---|
| Escamonina 1 | Citotoxicidad débil contra carcinoma epidermoide oral y contra el estafilococo resistente a meticilina |
| Escamonina 2 | Citotoxicidad débil contra carcinoma epidermoide oral |
| Ipomoesinas A-E | Citotoxicidad contra carcinoma ovárico |
| Orizabinas 1-4 | Laxante |
| Orizabinas 9-21 | Citotoxicidad contra carcinoma epidermoide oral, de colon, cervical de células escamosas y de ovario. |
| estansin 5 | Citotoxicidad contra carcinoma cervical y de ovario. |
| Tricolorina A | Fitotoxicidad, antibacteriano contra <i>Staphylococcus aureus</i> citotoxicidad contra carcinoma de mama, colon, cervical y de ovárico. |

Tabla 2. Algunos compuestos bioactivos del género *Ipomoea* (Meira *et al.*, 2012)

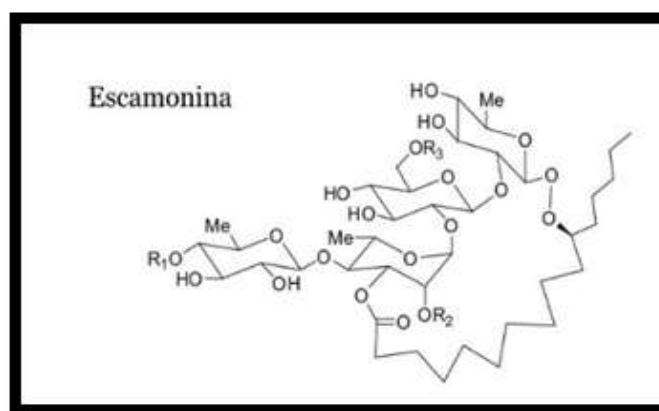


Figura 6. Estructura química del glicolípid escamonina (Meira *et al.*, 2012)

Resinas Glicosídicas

Se han encontrado gran diversidad de glicósidos en resinas del género *Ipomoea*, los cuales son compuestos anfipáticos cuya fracción hidrofóbica está compuesta por agliconas de ácidos grasos saturados con diferentes longitudes de cadena de 6 (ácido caproico) hasta 18 (ácido esteárico) átomos de carbono, además se ha observado que la mayoría contiene ácido jalapínico y ácido (11S)-hidroxihexadecanoico los cuales forman un anillo de macrolactona. Su parte hidrofílica está compuesta por un azúcar o glicona, son principalmente heteropolisacáridos. Las unidades de azúcar que se encuentran en estos metabolitos son D-glucosa y epímeros de pentosas L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-xilosa, en forma de piranosa. (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013; Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

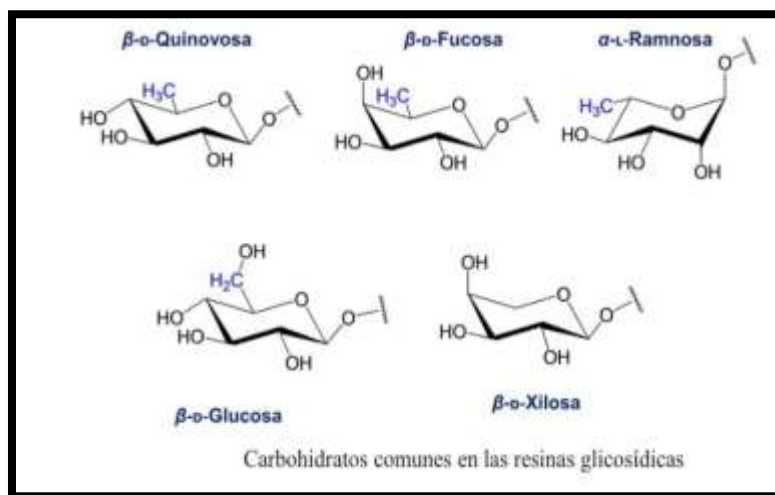


Figura 7. Glúcidos comunes de las resinas (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013)

Por otra parte los glicósidos de resina fueron clasificados en dos grupos en base a su solubilidad en éter: jalapina (soluble) y convolvulina (insoluble). En la jalapina se puede observar comúnmente la estructura de una macrolactona compuesta por un ácido glicosídico acilado. Sin embargo, la convolvulina se caracteriza por ácidos orgánicos y ácidos glicosídicos formados por la hidrólisis alcalina de varios glicolípidos mezclados (León-Rivera *et al.*, 2011; Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

Ipomoea tyrianthina

Es una planta perenne tipo rastrera o enredadera, cuenta con una raíz tuberosa que va desde 20 a 40 cm, tallo de 2 a 3 mm de diámetro y peciolo de 4 a 12 cm. de longitud. Sus hojas son cordiformes con ápice agudo o acuminado; las flores se encuentran solitarias o dispuestas en cimas multifloras en las axilas de las hojas; su corola es infundibuliforme de color rosado-púrpura de 5 a 8.5 cm de longitud, presentan frutos con 4 semillas de 4 a 5 mm de longitud de color café oscuro.

I. tyrianthina crece en la parte central y este de México localizándose en zonas de pastizal, matorral xerófilo y bosque pino-encino. Es conocida comúnmente como "raíz de escamonea", "queiebraplato", "manto de la virgen", "cuamoclit" en diferentes estados de la República Mexicana. La raíz ha sido utilizada en la medicina tradicional como purgante, sedante, antidepresivo, abortivo, hipotensor, antimicrobiano, citotóxico; además para el tratamiento de dolores abdominales, tumores, hidrocefalia, meningitis, trastornos renales y epilepsia. Diversos estudios con esta especie han demostrado que los compuestos aislados de la jalapina de *I. tyrianthina* tienen actividad sobre el sistema nervioso ya que presenta un efecto hipnótico, ansiolítico y protector (Castro, 2011; Mirón-López *et al.*, 2007; León-Rivera *et al.*, 2009; León-Rivera *et al.*, 2011; León-Rivera *et al.* 2014).

Clasificación Taxonómica

Orden: Solanales

Familia: Convolvulaceae

Género: *Ipomoea*

Especie: *tyrianthina*



Figura 8. *Ipomoea tyrianthina*
(<https://toptropicals.com/pics>)

II. ANTECEDENTES

Gracias a la diversidad de las glicoresinas en su estructura química se han podido realizar un gran número de estudios para identificar sus componentes y así poder determinar la actividad biológica de cada compuesto. Algunos trabajos han reportado que presentan actividad citotóxica, anticancerígena, purgativa, hemolítica, antibacteriana, antifúngica, reguladora del crecimiento de plantas y se han demostrado efectos anticonvulsivos producidos por extractos orgánicos solubles son los siguientes:

Chérigo *et al.* 2008. Aislaron 6 nuevos pentasacáridos denominados murucoidinas VI-XI y 7 compuestos ya conocidos (pescapreina III, estoloniferina I, y murucoidinas I-V) de resina de flores de *Ipomoea murocoides*. Se evaluó el potencial antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* que sobreexpresan la bomba de eflujo de NorA MDR, en donde las murucoidinas I, VI y VII mostraron actividad antimicrobiana, además todas las murucoidinas y la estoloniferina I potenciaron fuertemente la acción de la norfloxacin contra esta cepa. Sugiriendo que este tipo de oligosacáridos podrían desarrollarse adicionalmente para proporcionar inhibidores para las bombas de eflujo de múltiples fármacos.

León-Rivera *et al.* 2014. Evaluaron la actividad anticonvulsiva y neuroprotectora de estansin 6 un glicósido aislado de la raíz de *Ipomoea stans*. Inyectaron intraperitonealmente ácido kaínico a ratas para la inducción de convulsiones observando el comportamiento típico como sacudidas de perro y convulsiones límbicas, además de una degeneración y pérdida de células piramidales; determinando este comportamiento semejante a la epilepsia de lóbulo temporal que se presenta en humanos. El pretratamiento con estansin 6 inhibió las convulsiones y la muerte en ratas inducidas por el ácido kaínico a la misma dosis que ha sido reportada para fármacos antiepilépticos como fenitoina, valproato y fenobarbital. Además, no se presentó daño hipocampal en los animales y disminuyó la actividad astrocítica reduciendo la expresión de interleucinas (IL-1 β y TNF- α) utilizadas como marcadores proinflamatorios. Sugiriendo que los efectos anticonvulsivos del estansin 6 son selectivos y probablemente puedan provocar una inhibición de las corrientes de Ca²⁺ o bloqueo de la neurotransmisión mediada por los receptores del glutamato.

Jie-Hong *et al.* 2016. Aislaron dos glicósidos de la resina de *Ipomoea cairica* denominados cairicosido A y cairicosido B, utilizando métodos espectroscópicos y químicos. Determinaron que ambos compuestos presentaban una fuerte actividad inhibitoria para alfa-glucosidasa.

León-Rivera *et al.* 2016. Realizaron un estudio de la convolvulina de *Ipomoea purga*, *Ipomoea stans* e *Ipomoea murucoides*, obteniendo seis nuevos glicósidos de resina determinando sus estructuras mediante una combinación de espectroscopia de RMN y espectrometría de masas. Los compuestos encontrados fueron jalapinosido B (1, nuevo glicósido de resina aislado de *Ipomoea purga*), ácido purgico D (2), ácido estansoico A (3), estansina A (4, primer glicolípido heterodimero tipo éster aislado de *I. stans*), ácido murucinico II (5) y ácido estansinico I (6). Todos los compuestos se sometieron a un ensayo citotóxico utilizando células cultivadas de carcinoma de colon (HCT-15), cervical (UISO-SQC-1) y ovárico (OVCAR-5). Los compuestos 1,2,3,5 y 6 mostraron un efecto discreto frente a la velocidad proliferativa hacia las líneas celulares de cáncer HCT-15 y OVCAR-5. Sin embargo, fue el compuesto 4 el que mostro una mayor actividad contra OVCAR-5, pero mostro menos citotoxicidad contra HCT-15 y UISO-SQC-1. Además, el compuesto 1 mostro una actividad antiproliferativa sobre las células tumorales de glioma C6 y RG2.

Se han reportado diversos metabolitos secundarios obtenidos de la resina de *Ipomoea tyrianthina*, lo cual ha aumentado el interés en el desarrollo de nuevas investigaciones que permiten determinar la actividad biológica de los compuestos. En donde se han reportado que los glicolípidos, tetrasacáridos, etc. presentan diversos efectos contra convulsiones, bacterianas causantes de enfermedades, etc. como a continuación algunos autores lo reportan:

Mirón-López *et al.* 2007. Aislaron seis glicolípidos ya conocidos y siete nuevos glicósidos tetrasacáridos (tiriantinas 1-7) de *Ipomoea tyrianthina*. Se estudiaron los glicósidos de la resina obtenida de las raíces, las cuales fueron colectadas en tres regiones diferentes (Puebla, Morelos y Distrito Federal) observando que la composición química del extracto fue idéntica en temporada de floración o de seca para la misma localidad; sin embargo, la composición de los glicósidos se ve afectada de acuerdo a la localidad de crecimiento. Identificaron que las estructuras moleculares de las tiriantinas eran muy similares a los glicolípidos aislados de la raíz *Ipomoea stans*, los cuales habían mostrado actividad en el sistema nervioso central (SNC) de ratón. Por lo cual examinaron la actividad de tres compuestos (tiriantina 6, escammonina I y escammonina II) en el SNC de ratón. La administración intraperitoneal de tiriantina 6 en ratones presentó actividad antidepressiva; además observaron que tiriantina 6, escammonina I y escammonina II permitían la protección (dependiente de la dosis) contra convulsiones inducidas por pentilenotetrazol. Además, tiriantina 6 y escammonina I producen un efecto relajante en las contracciones espontáneas del ileum en rata.

León-Rivera *et al.* 2008. Realizaron un estudio de la raíz de *I. tyrianthina* aislando cuatro nuevos tetrasacáridos parcialmente acilados del ácido 11-hidroxihexadecanoico a los cuales se les denominó: ácido tiriantínico I, ácido tiriantínico II, tiriantina VIII y tiriantina IX. Todos los compuestos mostraron tener actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*. Además, los cuatro fueron evaluados para observar su actividad citotóxica usando líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo, colon, cervical y ovárico; en donde pudieron identificar actividad únicamente con la línea celular de carcinoma nasofaríngeo. Asimismo, evaluaron la actividad de los compuestos en ratón observando que aumentaban la latencia y duración de la hipnosis inducida por pentobarbital, protegen contra convulsiones inducidas por pentileno tetrazol y aumentan la liberación de ácido glutámico. La administración de Tiriantina VIII y IX en rebanadas de cerebro de ratón indujeron al incremento de GABA.

León-Rivera *et al.* 2009. Estudiaron la resina glicosídica contenida en la raíz de *I. tyrianthina* de donde aislaron y caracterizaron dos nuevos glicolípidos heteródimeros tipo éster: tiriantina A y B, los cuales mostraron un efecto vasorelajante significativo en el endotelio intacto del arco aórtico. Los resultados indicaron que los compuestos (tiriantina A y B) producían su efecto vasorelajante a través de factores derivados del endotelio como la ciclooxigenasa, factor hiperpolarizante (EDHF) y la vía óxido nítrico sintasa. Determinaron a través de un bioensayo en rebanadas de cerebro de ratón, que tiriantina A y B incrementaban la liberación de GABA y de ácido glutámico, efecto similar a lo observado en glicolípidos tetrasacáridos aislados de *I. stans*. También determinaron que estos compuestos presentaban actividad antimicrobiana débil, sugiriendo que este comportamiento se debe al aumento del peso y complejidad molecular de los glicolípidos.

León-Rivera *et al.* 2011. Evaluó los efectos producidos por la convolvulina de la raíz de *I. tyrianthina* en el sistema nervioso central. Observando que al utilizar pentileno tetrazol inductor de convulsiones no existió ninguna protección en los ratones, sin embargo, al administrar pentobarbital sódico inductor de hipnosis incrementaba la latencia y duración de la hipnosis. También determinaron que existía un efecto vasodilatador significativo dependientes de la concentración y del endotelio en el aislado de aorta en rata, pero no existió una inhibición significativa de las contracciones en el íleon, colon y yeyuno. Además, indicaron mediante un ensayo citotóxico que el compuesto presentaba actividad contra la línea celular KB del carcinoma nasofaríngeo.

Castro-García 2011. Realizó un ensayo in vitro de dos compuestos aislados de *I. tyrianthina*, ácido tiriantínico II y tiriantina I observando que el efecto de estos aumentaba la liberación y concentración de GABA. Asimismo, determino el posible mecanismo de acción del ácido tiriantínico II y tiriantina I sobre el sistema GABAérgico analizando tres vías: despolarización asociada al flujo de iones (Na^+ / Ca^{2+}) extracelulares al medio intracelular, bloqueo del receptor GABA_B e inhibición de la recaptura de GABA. Determinando que tiriantina I se vio totalmente modificada en ausencia de sodio ya que disminuyó su efecto, lo que indica una dependencia de la actividad del compuesto por la presencia de sodio extracelular, por lo cual se sugirió que tiriantina I podría estar modificando la actividad de GAT o la función del canal de sodio. Por otra parte al realizar las pruebas con el ácido tiriantínico II se pudo observar dos efectos sobre el sistema GABAérgico: uno sobre la actividad del transportador de GABA (GAT) a nivel neuronal y glial, en donde el ácido tiriantínico II afecta de alguna forma el mecanismo de recaptura ya sea inhibiendo o activando su función reversa. Y la segunda afectando la actividad reguladora del receptor GABA_B , donde el ácido tiriantínico II pudiera competir por el sitio de unión a GABA.

León-Rivera *et al.* 2014. Aislaron y purificaron al ácido tiriantinoico ya conocido y 7 nuevos glicolípidos denominados: ácido tiriantinico III, IV, V, VI y tiriantinas C, D y E. Experimentos en ratones determinaron que las tiriantinas C, D y E; no presentaban ninguna actividad protectora contra las convulsiones inducidas por pentilentetrazol sin embargo protegían parcialmente a los animales contra la muerte. Además, se observó un efecto sedativo y un incremento en la liberación de GABA (principalmente por tiriantina C). De igual forma se pudo observar un efecto vasorelajante en el arco aórtico dependiente de la concentración y del endotelio.

Noda *et al.* 1990. Aislaron de la raíz de *Convolvulus scammonia* dos compuestos: escamonina I y escamonina II. Filtraron la raíz con metanol dividiendo el extracto en éter y agua. La porción soluble en éter se sometió sobre Sephadex LH-20 y cromatografía en columna de gel de sílice, purificándola por HPLC preparativa repetitiva, para proporcionar los dos glucósidos de resina.

Castro-García 2017. Evaluaron dos compuestos escamonina I y tiriantina C aislados de *I. tyrianthina* en un modelo convulsivo en ratones utilizando pentilentetrazol. Observaron que el pretratamiento con estos compuestos presentaba un efecto anticonvulsivo dosis dependiente, donde disminuían las convulsiones así como su severidad, además que se alargaba el tiempo de latencia. Determinaron que la dosis de 80 mg/Kg de escamonina I tuvo mejor efecto neuroprotector. Sugiriendo que ambos compuestos presentaban actividad antiinflamatoria ya que el edema intersticial y la gliosis disminuía en los ratones tratados previamente con escamonina I y tiriantina C, evitando de esta manera la neurodegeneración y así mismo manteniendo la viabilidad neuronal cortical.

III. JUSTIFICACIÓN

La inflamación se ha propuesto en diversos estudios como un factor crítico de la patogénesis de diversas enfermedades neurológicas como Epilepsia, Alzheimer, Parkinson y Esclerosis múltiple, en las cuales existe una liberación de citocinas en el cerebro que junto con el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno (ROS) generan un daño neuronal. Actualmente la búsqueda de nuevos tratamientos fitoterapéuticos ha incrementado, debido a que los medicamentos sintéticos provocan un aumento paulatino de la dosis, así como la dependencia a estos; por lo cual la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios que actúen sobre la liberación de citocinas y ROS son considerados como una alternativa clave para la prevención de la neurodegeneración en enfermedades del Sistema Nervioso Central.

En el presente trabajo se pretende determinar si escamonina I y el compuesto aromático presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante, estableciendo su mecanismo de acción contra las concentraciones de los mediadores pro-inflamatorios y frente al estrés oxidativo, proporcionando de esta manera un mayor conocimiento de los distintos metabolitos secundarios de plantas con acción contra la neurodegeneración, lo cual podría permitir el diseño de nuevas opciones farmacológicas para contribuir a un mejor tratamiento.

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos aislados de *Ipomoea tyrianthina* inhiben la activación de las células gliales, disminuyendo de esta manera las concentraciones de mediadores pro-inflamatorios y el estrés oxidativo, lo cual disminuirá el proceso inflamatorio en rebanadas de cerebro de ratón.

V. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el efecto *in vitro* de escamonina I y el compuesto aromático aislados de *Ipomoea tyrianthina* sobre la activación de las células gliales inducida por lipopolisacáridos en cerebro de ratón.

Objetivos particulares:

- Establecer un modelo *in vitro* de neuroinflamación inducido por lipopolisacáridos en rebanadas de cerebro de ratón.
- Determinar el efecto de los compuestos sobre la liberación de mediadores pro-inflamatorios, inducida por lipopolisacáridos.
- Identificar el efecto de los compuestos sobre la activación de las células gliales inducida por lipopolisacáridos.
- Determinar el efecto de los compuestos sobre el estrés oxidativo, inducido por lipopolisacáridos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental

Se utilizarán ratones (*Mus musculus*) cepa CD-1 con un peso entre 20-30 g. proporcionados por el bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Todos los experimentos se realizarán de acuerdo con el Reglamento Federal de Experimentación y cuidado animal (NOM-062-ZOO-199, México).

Compuesto aromático y Escamonina I

Fueron proporcionados por el Dr. Ismael León Rivera del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM).

Ensayos de liberación de mediadores pro-inflamatorios

Para determinar la presencia de mediadores pro-inflamatorios en cerebro de ratón se realizó un análisis de cerebros incluidos en parafina los cuales fueron obtenidos de un experimento previo realizado dentro del grupo de investigación; en el cual el M. en B. Manuel Castro llevó a cabo una evaluación del efecto anticonvulsivo y neuroprotector de escamonina con diferentes dosis en un esquema agudo (30 minutos pre-tratamiento, 40-80-120 mg/kg) en un modelo de convulsión con PTZ (70 mg/kg).

A continuación el tejido fue seccionado en serie en un micrótopo, del cual se obtuvieron cortes sagitales de cerebro de aproximadamente 5-6 μm de grosor, cada corte fue colocado en un baño de flotación y posteriormente colocados en portaobjetos, posteriormente se realizó el estudio inmunohistoquímico en el cual las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios Anti-IL1- β , Anti-TNF- α y Anti-IL-6, finalmente cada preparación fue analizada mediante microscopía óptica, para detectar las células inmunorreactivas para las citocinas anteriormente mencionadas.

Los experimentos de liberación de mediadores pro-inflamatorios se realizarán in vitro, mediante un sistema de incubación como a continuación se describe:

1. Obtención de rebanadas de cerebro

Los ratones serán sacrificados por dislocación cervical para proceder con la disección del cerebro sobre una placa de hielo triturado. Posteriormente, una vez extraído el cerebro, se realizarán cortes sagitales para la obtención de rebanadas de cerebro (250-300 μm de grosor) con una navaja de rasurar y un cubreobjetos de guía. Se incubarán en 2 ml de buffer Krebs-Ringer modificado (medio basal) a un pH de 7.4 y se mantendrán a 4°C en constante aireación por no más de 5 minutos (Gutiérrez y Delgado, 1989; Abarca, 2000).

| Reactivos | Medio basal |
|--|-------------|
| NaCl | 118.0 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1.18 mM |
| KCl | 4.7 mM |
| CaCl ₂ | 2.5 mM |
| MgSO ₄ | 1.18 mM |
| C ₄ H ₁₁ NO ₃ | 20.0 mM |
| Glucosa | 5.6 mM |

Tabla 3. Composición del Buffer Krebs-Ringer (Abarca, 2000)

Las rebanadas de cerebro de ratón se aclimatarán en un vial con medio basal (Krebs-Ringer modificado) durante 10 minutos en constante aireación a 36°C, lo cual simulará las condiciones fisiológicas del tejido. Después los tejidos se colocarán en viales con 2.0 ml de medio basal en constante aireación a 36°C.

2. Liberación de mediadores pro-inflamatorios

Posteriormente se prepararán las condiciones de trabajo: control y experimentales. Los ensayos control negativo valorarán las condiciones sin estímulo (basales) y con estímulo (Lipopolisacáridos) en presencia de H₂O/MeOH; además, se establecerán dos controles positivos usando fármacos antiinflamatorios que inhiben la liberación de IL-1 β y TNF- α (Anakinra y Etanercept, respectivamente). Las condiciones experimentales se prepararán de la misma forma que los ensayos basales, pero adicionando escamonina I a diferentes concentraciones. Permitiendo de esta manera evaluar el efecto de escamonina I sobre los mediadores pro-inflamatorios.

| Condiciones control: |
|---|
| Control: |
| a) H ₂ O/MeOH (vehículo) b) Medio basal |
| Control Negativo: |
| c) Lipopolisacáridos a dos concentraciones 5 ng/ml y 5 µg/ml, <i>Escherichia coli</i> 0111:B4, Sigma (Landry et al., 2012) |
| Control Positivo: |
| d) Anakinra (IL-1β) 5µg/ml (So et al., 2007) + Lipopolisacáridos |
| e) Etanercept (TNF-α) 5µg/ml (Li et al., 2016) + Lipopolisacáridos |
| Condiciones experimentales: |
| a) Escamonina I a diferentes concentraciones (5,10 y 20 µg/ml) b) Escamonina I (pretratamiento 5 min antes) + Lipopolisacáridos c) Escamonina I + Lipopolisacáridos |

Tabla 4. Condiciones experimentales

3. Medición de mediadores pro-inflamatorios

Las condiciones experimentales se tratarán en diferentes tiempos (5, 30 y 60 minutos) en los cuales se obtendrá el sobrenadante de las muestras para determinar las concentraciones de mediadores pro-inflamatorios en estas, mediante un ensayo inmunoenzimático (RAB0271 Sigma Mouse IL-1β ELISA Kit, RAB0477 Sigma Mouse Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Koshinaga et al., 2000).

Ensayo inmunohistoquímico

Se observará mediante un análisis inmunohistoquímico de cortes sagitales de cerebro de ratón la activación y posibles alteraciones de las células gliales durante la neuroinflamación.

Las rebanadas de cerebro de ratón se lavarán con PBS (dos veces durante 5 minutos), se incubarán en citrato de sodio 0.1 M (pH 6) en un baño de agua durante 30 minutos y se aclararán tres veces en buffer PBS durante 5 min. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones se incubarán en peróxido de hidrogeno al 3% durante 30 min, se lavarán en PBS (dos veces durante 5 min.) y se incubarán en 1% de albumina de suero bovino durante 1 hora.

Después de dos lavados consecutivos con PBS, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C en PBS-BSA que contendrá los anticuerpos primarios GFAP (sigma), integrina α M- CD11b (sigma), IL-1 β (Monoclonal Anti-IL1B antibody produced in mouse clone 2A8, Sigma) o TNF- α (Anti-Tumor Necrosis Factor- α antibody produced in mouse clone 45418.111, sigma) a una dilución 1:100. Posteriormente de lavar nuevamente con PBS, se incubará con anti-IgG biotinilado, luego con estreptavidina peroxidasa y finalmente se incubarán con peróxido de hidrogeno-diaminobencidina. Las secciones se contrastarán con hematoxilina. Por último se analizará el número de células activadas (Aguirre-Moreno *et al.*, 2013; Nillert *et al.*, 2017).

Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH

El 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) es un oxidante que tiene en su estructura un electrón impar el cual es estable en metanol, este compuesto tiene la capacidad de aceptar átomos de H proporcionados por algún antioxidante. Este método se basa en la espectrofotometría, debido a que el DPPH presenta una coloración purpura la cual cambia a amarillo cuando pasa a su forma reducida (difenilpicrilhidracina) al tener contacto con el antioxidante (Figura 9)(Dawidowicz *et al.* 2012; Thanh *et al.* 2017; Sharma & Bhat 2009).

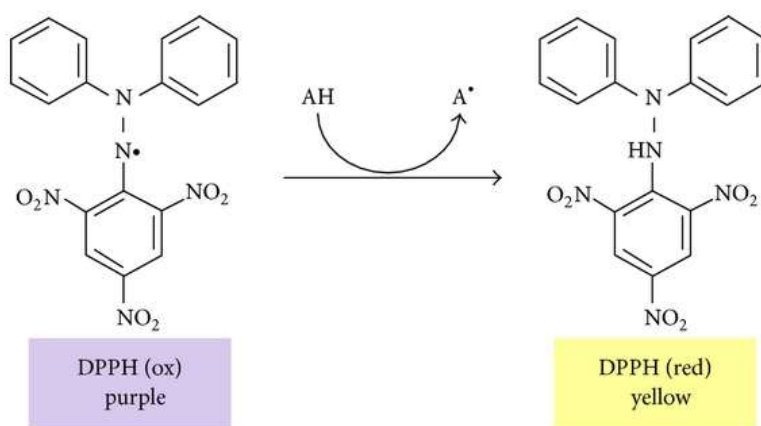


Figura 9. Reacción del DPPH en presencia de un compuesto antioxidante.

El ensayo se realizó en placas de ELISA de 96 pozos en los cuales se añadieron 200 μL de solución de DPPH a una concentración de 0.1 mM y 50 μL de la muestra (escamonina, extracto convolvulina y compuesto aromático). Se usaron como blanco de solventes agua destilada y metanol, el DPPH fue tomado como control positivo y como control negativo se utilizó ácido ascórbico (referencia estándar) a una concentración 11.8 μM (IC_{50}). Los compuestos estudiados y el extracto convolvulina se analizaron a diferentes concentraciones 40, 80, 160, 320, 640, 1280 y $\mu\text{g/mL}$. Se utilizaron como solventes agua destilada y metanol de acuerdo a las características de la muestra cómo se describe en la Tabla 5, el ensayo se llevó acabo a temperatura ambiente y en oscuridad, incubándose durante 30 min. Después de esto se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro, las pruebas se realizaron por triplicado (Oluwayinka *et al.* 2018; Padmapriya *et al.* 2017; Sharma & Bhat 2009).

| Muestra | Solvente |
|-----------------------|--------------------------------|
| DPPH | Metanol |
| Ácido ascórbico | Agua destilada |
| Escamonina | 20% Metanol 80% Agua destilada |
| Extracto convolvulina | 20% Metanol 80% Agua destilada |
| Compuesto aromático | 20% Metanol 80% Agua destilada |

Tabla 5. Compuestos y disolventes.

El porcentaje de inhibición de radicales libres de los compuestos y el extracto en DPPH se determinó mediante la siguiente fórmula (Padmapriya *et al.* 2017):

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Abs control} - \text{Abs test}}{\text{Abs control}} \right) * 100$$

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizará mediante el programa GraphPad Prism Software. Se utilizará un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia entre los resultados, considerando como diferencias estadísticamente significativas si el valor de p es <0.05 (Salemme *et al.*, 2016).

Resultados Preliminares

Se realizó la evaluación inmunohistoquímica a tres secciones del tejido cerebral de los ratones de estudio; 1) corteza, 2) hipocampo (giro dentado GD, CA1 y CA3) y 3) cerebelo (Figura 9) para determinar la expresión de interleucinas pro-inflamatorias ((IL1- β , TNF- α e IL-6).

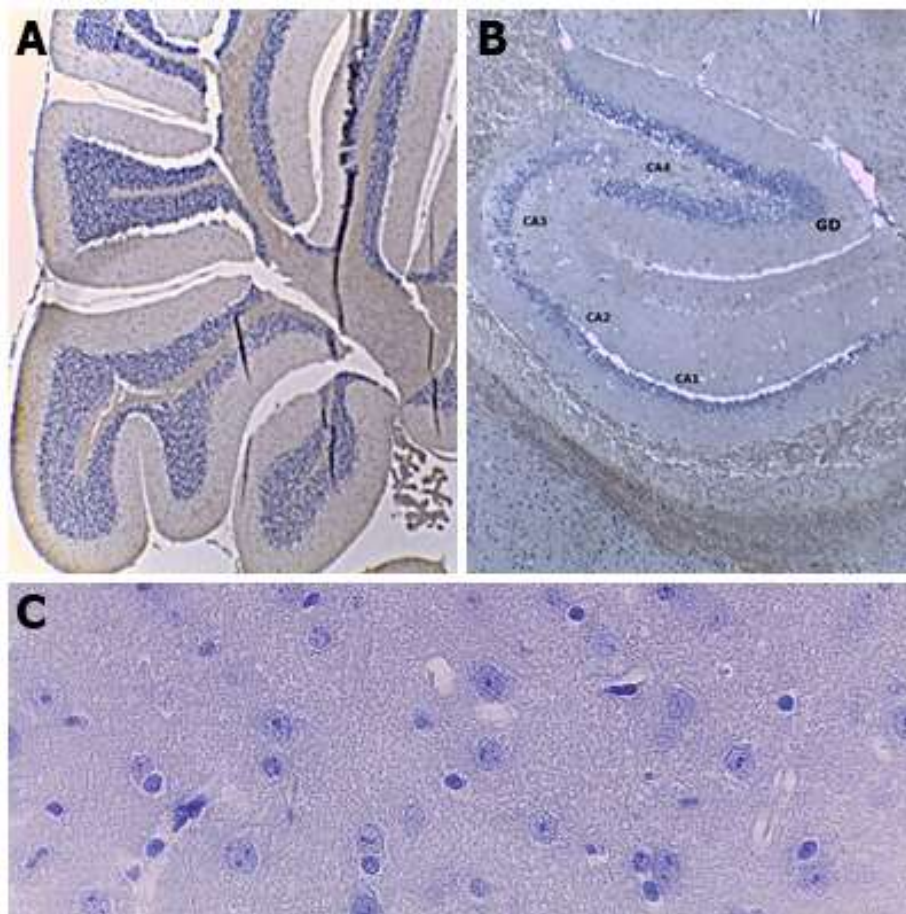


Figura 10. Regiones de estudio de tejido cerebral con vehículo A) Cerebelo, B) Hipocampo y C) Corteza, observando que las neuronas del tejido no presentan expresión de interleucinas pro-inflamatorias (IL1- β , TNF- α e IL-6) 40X.

En esta fase experimental se analizaron las tres dosis de escamonina I identificando que la concentración de 120 mg/Kg presenta un efecto neurotóxico debido a que se observaron células reactivas a las interleucinas pro-inflamatorias (IL1- β , TNF- α e IL-6), así como daño severo, esto se sugiere debido a la presencia de células picnóticas y edema intersticial (Figura 10). Sin embargo al realizar la comparación con las células neuronales de las dosis bajas (40 y 80 mg/Kg) y el vehículo, no se identificó ninguna de las características mencionadas anteriormente.

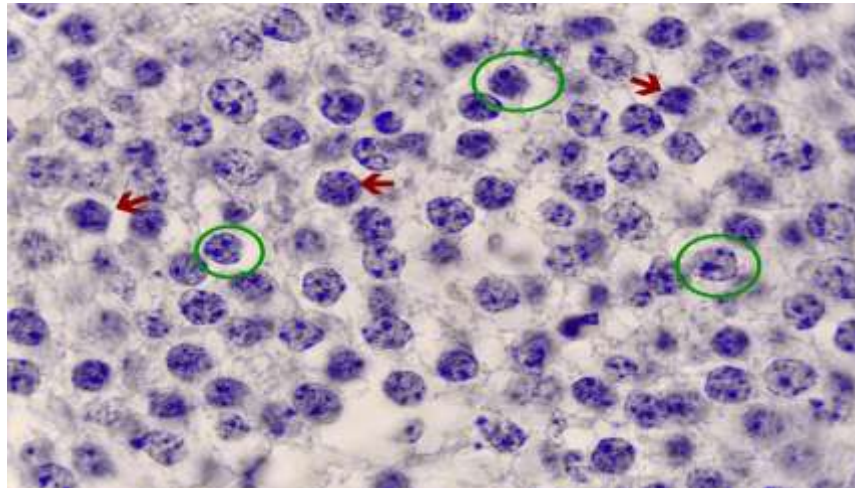


Figura 11. Escamonina I 120 mg/Kg, inmunohistoquímica de Giro Dentado con flechas rojas se señalan células reactivas para la IL1-β y con círculos verdes algunas zonas con presencia de edema. 100X.

Por otra parte al observarse las laminillas con el tratamiento del agente convulsivante PTZ se identificó que las características de las neuronas eran muy semejantes respecto a lo reportado por el grupo de escamonina I 120 (Figura 11). Al compararse las 3 regiones para poder identificar la zona en la cual podría identificarse mayor daño por la administración de PTZ, se obtuvo como resultado que el hipocampo presentó mayor inmunorreactividad para los anticuerpos específicos de IL1-β, TNF-α e IL-6 (Figura 12); principalmente en las secciones de giro dentado, CA1 y CA3. Sin embargo al analizar las otras dos secciones consideradas para el estudio se observó que existía menor cantidad de células reactivas en corteza, y en el caso de cerebelo no se presentó expresión de ninguna de las tres citocinas (Figura 13).

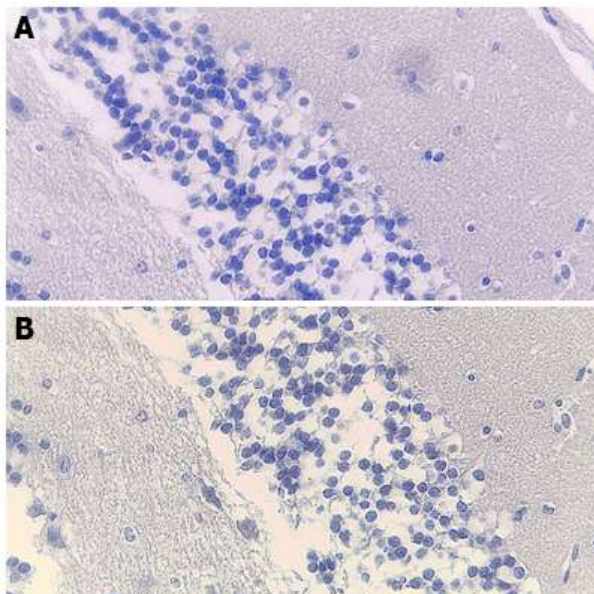


Figura 12. Inmunorreactividad anti-TNF-α en A) Laminilla con PTZ y B) Escamonina I 120 mg/Kg 40X.

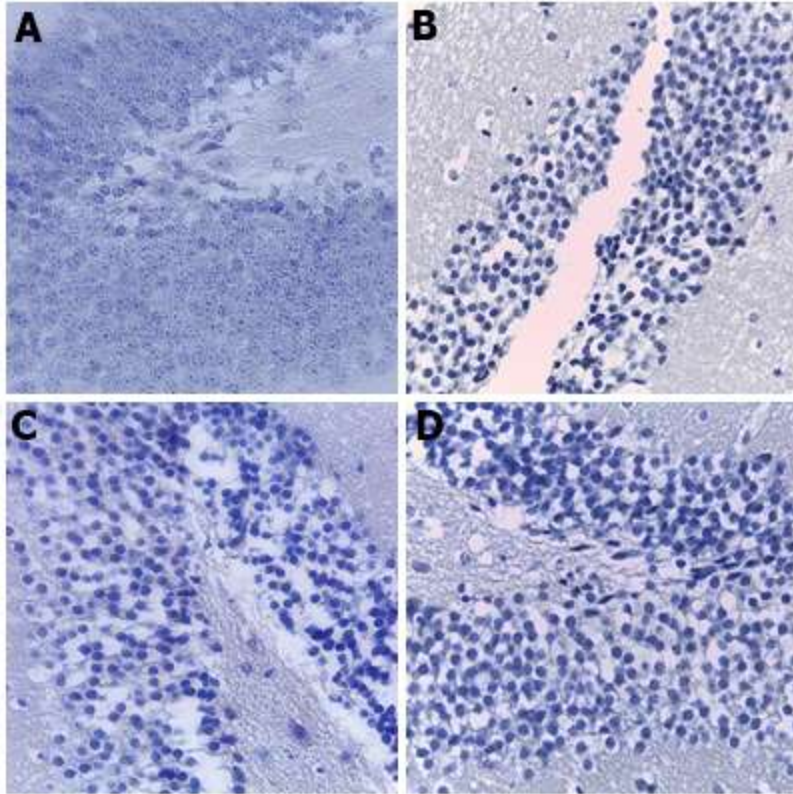


Figura 13. Giro dentado dañado por PTZ en donde se observan neuronas con inmunorreactividad para IL-6 (B), TNF- α (C) e IL1- β (D), se puede observar en (A) la presencia del vehículo en el cual no se identificaron células reactivas para los anticuerpos de las interleucinas proinflamatorias 40X.

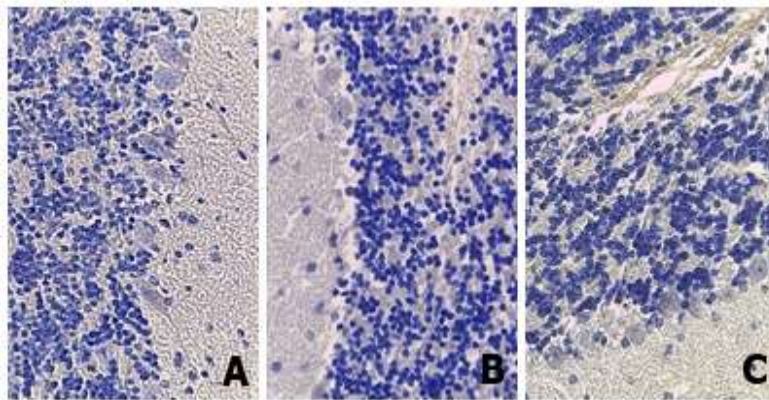


Figura 14. Cerebelo sin presencia de células reactivas para anticuerpos IL1- β (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) 40X.

No obstante dentro de las 5 regiones del hipocampo (GD, CA1, CA2, CA3 y CA4) las zonas que presentaron una mayor densidad de marca en la evaluación de las citocinas fueron el giro dentado, CA1 y CA3, en las cuales además se pudieron observar mayor cantidad de zonas con edema intersticial (Figura 14).

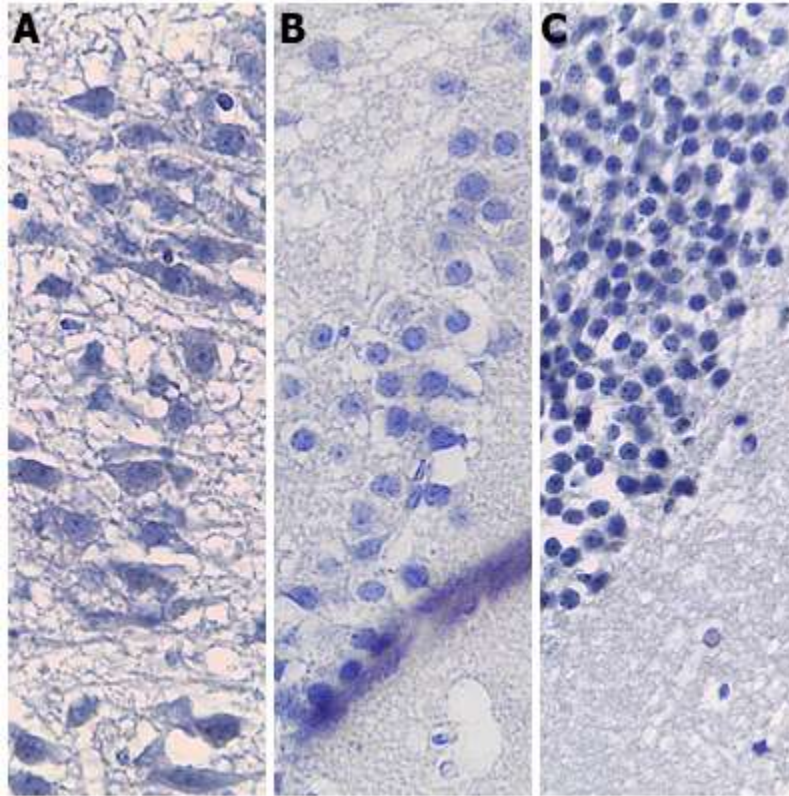


Figura 15. Secciones de Hipocampo con daño por PTZ. A) células CA3 reactivas anti- IL1- β , B) células CA1 reactivas TNF- α y C) células giro dentado anti-IL-6 40X.

De acuerdo a estos resultados se llevó a cabo el análisis de las muestras con el co-tratamiento de PTZ y escamonina I (únicamente con las concentraciones de 40 y 80 mg/Kg), mientras el grupo con PTZ incrementa la presencia de células reactivas a las citocinas, se pudo observar un efecto contrario en las laminillas de los ratones que recibieron un pre-tratamiento con escamonina I, en las cuales la respuesta al estímulo de daño provocado por PTZ fue menor, dado a que este metabolito secundario parece haber prevenido el efecto neurotóxico del agente convulsivante, ya que se pudieron observar mayor número de células con núcleos definidos, menor cantidad de células reactivas a los anticuerpos de las interleucinas y en donde el edema intersticial disminuyo significativamente al observarse en el microscopio (Figura 15 y 16).

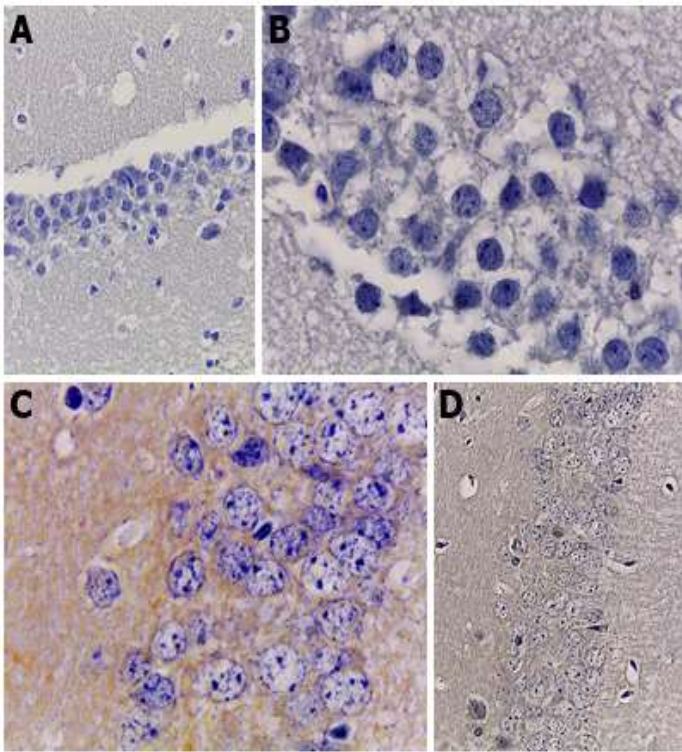


Figura 16. Comparación de la Región CA1 con PTZ (A y B); y del co-tratamiento de PTZ-Escamonia I (C y D) utilizando el anti-IL1- β , A y D 40X; B y C 100X.

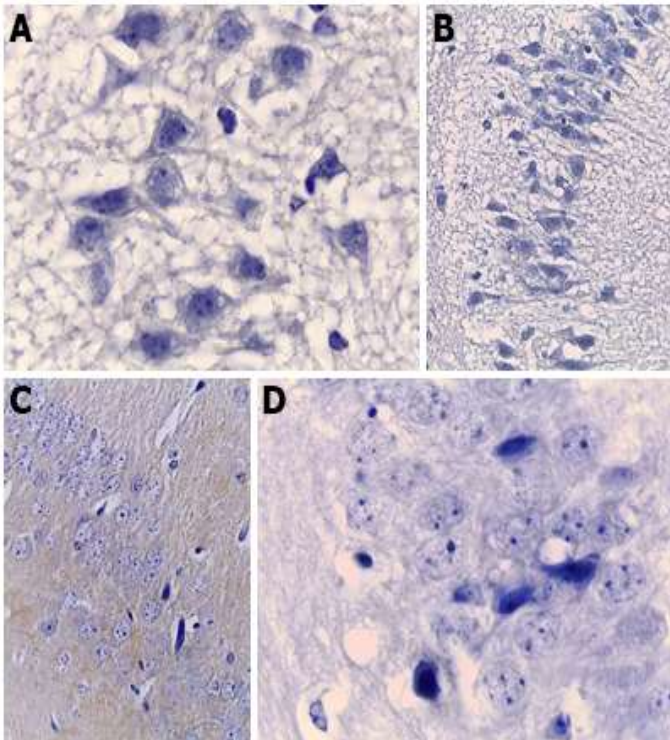


Figura 17. Comparación de la Región CA3 con PTZ (A y B); y del co-tratamiento de PTZ-Escamonia I (C y D) utilizando el anti-IL1- β , A y D 100X; B y C 40X.

Finalmente se realizó la técnica inmunohistoquímica a laminillas de cerebro de ratones tratados con valproato de sodio (fármaco anticonvulsivo), en donde se pudo observar que el edema intersticial observado anteriormente disminuía en todas las secciones estudiadas, sin embargo la inmunorreactividad de las células hacia las interleucinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α seguía presente, caso contrario a lo observado en las laminillas con el tratamiento de escamonina I.

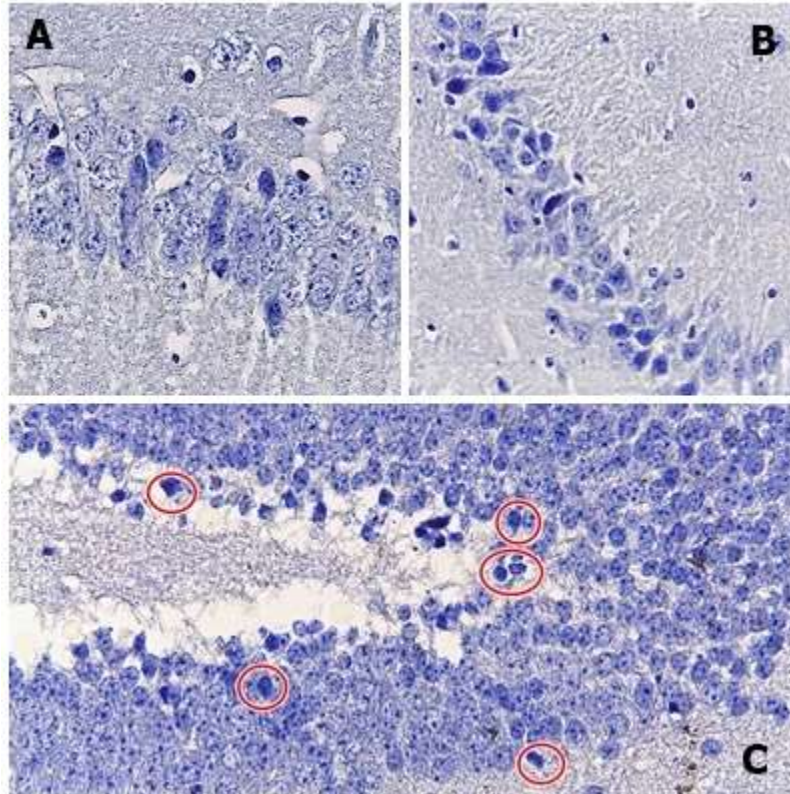


Figura 18. Laminillas tratadas con Valproato de sodio 40X. A) Sección CA1 IL-6; B) Sección CA3 IL-1 β y C) Giro dentado TNF- α .

Al realizar el ensayo para determinar la capacidad de captura del radical DPPH por el compuesto puro escamonina I, se observa que no presenta actividad antioxidante ya que al utilizar concentraciones de 40 a 1280 $\mu\text{g/mL}$ no se observó variación en los porcentajes de inhibición (I%) tomando la máxima concentración del compuesto (I%=1.60) comparado con el antioxidante ácido ascórbico (I%=52.02) como se puede observar en el Gráfico 1.

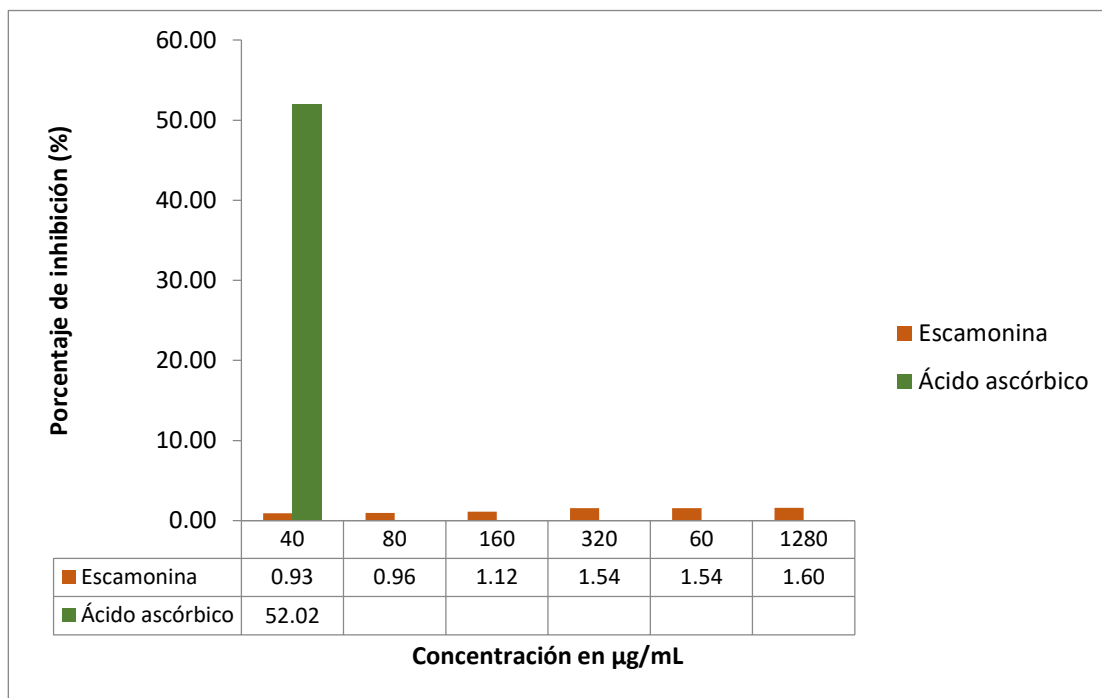


Gráfico 1. Porcentajes de captura del radical DPPH por el compuesto escamonina.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente se llevó a cabo la evaluación de extractos de *Ipomoea tyrianthina* con el fin de determinar si existía la presencia de algún metabolito secundario con actividad antioxidante. Al realizar el ensayo con el extracto convolvulina se pudo observar la disminución del radical DPPH, el cual mostró un mayor porcentaje de inhibición comparado con escamonina I con un 10.26% a una concentración máxima de 1280 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2).

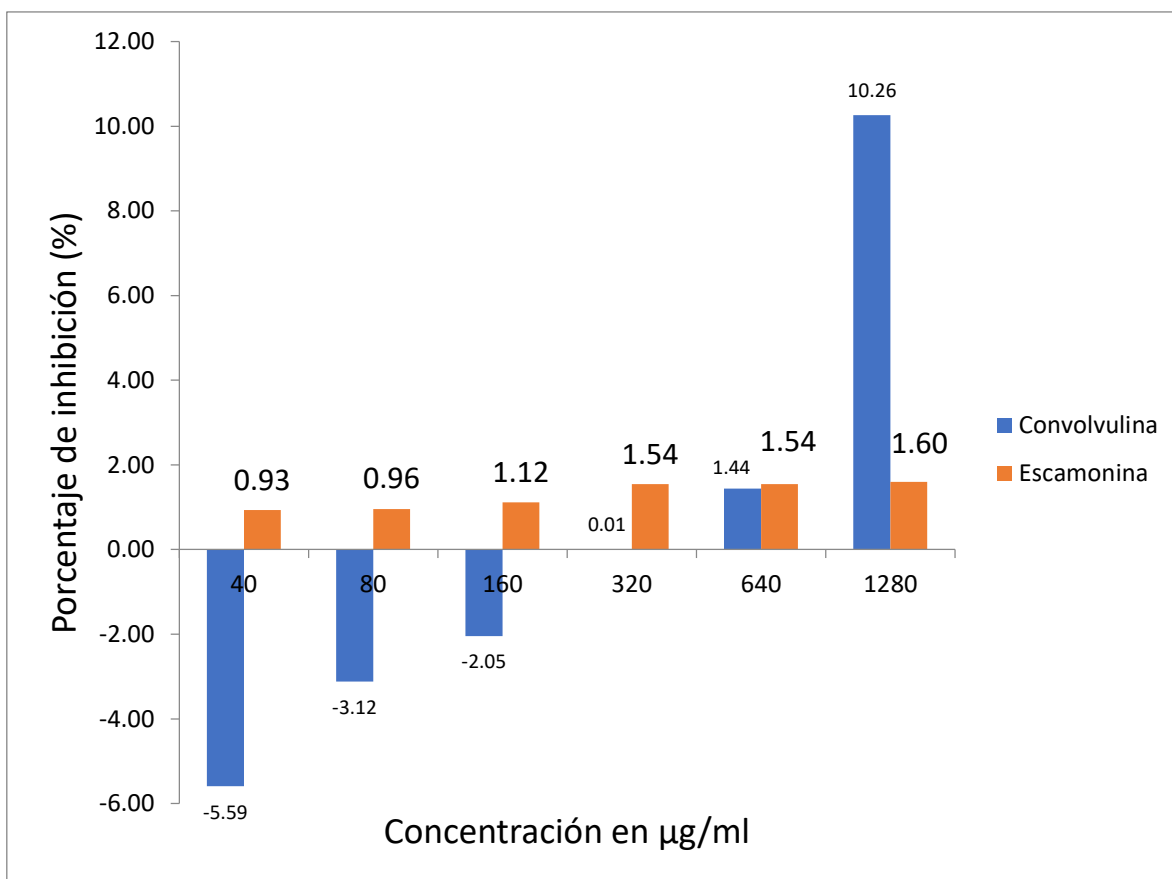


Gráfico 2. Ensayo DPPH de escamonina comparado con el extracto convolvulina.

Debido al porcentaje encontrado en el ensayo anterior se sugirió analizar un compuesto aromático aislado del extracto convolvulina, para identificar si el porcentaje de inhibición anteriormente observado podría deberse a la acción de este compuesto. De igual manera se llevó a cabo el análisis a las mismas concentraciones utilizadas para escamonina y el extracto convolvulina, obteniendo como resultado que el compuesto aromático presenta la capacidad de donar H al radical DPPH, ya que lo reduce de una manera semejante al antioxidante ácido ascórbico (Gráfico 3). Se identificó que la concentración mínima (40 µg/mL) podía inhibir un 48.16% del radical, llegando a un máximo del 88.02% a una concentración de 640 µg/mL (Tabla 7).

| Compuesto Aromático | | | | | | |
|---------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Concentración | 40 µg/mL | 80 µg/mL | 160 µg/mL | 320 µg/mL | 640 µg/mL | 1280 µg/mL |
| I% | 48.16 | 71.25 | 84.03 | 87.35 | 88.02 | 87.98 |

Tabla 7. Porcentajes de inhibición del radical DPPH por el compuesto aromático.

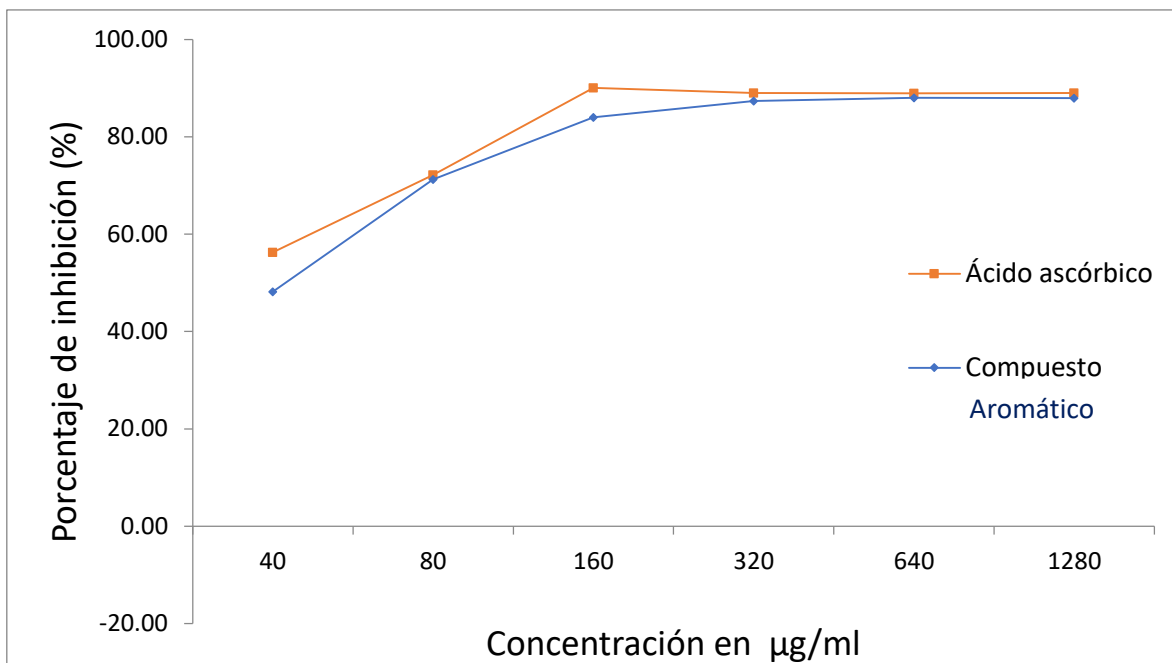


Gráfico 2. Comparación de porcentajes de inhibición de DPPH por el compuesto nuevo comparado con el antioxidante estándar ácido ascórbico.

Ensayos de Peroxidación de lípidos en cerebro de ratón

Obtención del tejido cerebral

Las actividades realizadas durante este semestre se enfocaron en la estandarización del modelo de daño inducido por lipopolisacáridos. Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, la disección del cerebro se realizó sobre una placa de hielo triturado, utilizando un hemisferio para cada tratamiento. Posteriormente el tejido se homogenizó en 10 volúmenes de buffer de Krebs-Ringer (1:10 peso tejido/volumen); sin embargo, al no observarse daño se decidió realizar el ensayo en rebanadas de cerebro obtenidas de cortes sagitales (600-900 μm de grosor), estas se mantuvieron en 1 ml de buffer Krebs-Ringer (medio basal) en constante aireación (Gutiérrez y Delgado, 1989; Abarca, 2000).

Estandarización del modelo de daño con LPS

En la estandarización del modelo de daño se evaluaron 4 concentraciones 125, 250, 500 y 1250 ng/ mL (Leonoudakis et al. 2017; Wang et al. 2017). Las muestras (homogenizado y rebanadas) se colocaron en un plato de cultivo celular de 24 pozos con 1 mL de LPS, este se dejó en constante aireación durante 1 hr. Posteriormente se realizó el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinar si el estímulo con LPS reflejaba la peroxidación de lípidos en el cerebro.

Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se realizó la reacción con 200 μL del homogenizado de tejido cerebral y 500 μL de la solución TBARS colocados en tubos eppendorf, posteriormente se incubaron en baño de agua hirviendo durante 30 minutos, en esta fase de la técnica debió observarse un cambio en la coloración de las muestras que presentan peroxidación de lípidos, sin embargo este cambio no ocurrió, la reacción se detuvo colocando los tubos en hielo por 5 minutos y por último se centrifugaron 3000g x 15 minutos. La lectura del sobrenadante se midió a 532 nm en un espectrofotómetro (Vidal-Martins *et al.*, 2016). Al observar los valores de absorbancia de las muestras no se detectaron diferencias entre el control negativo (solo buffer de Krebs-ringer) con respecto a las diferentes concentraciones del LPS (Tabla 8).

| Curva [TMPO] | 0 μl | 1 μl | 2 μl | 5 μl | 10 μl | 20 μl | 40 μl |
|--------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Absorbancia | 0.039 | 0.0405 | 0.041 | 0.044 | 0.0715 | 0.1735 | 0.4965 |
| LPS | Control negativo | 250 $\mu\text{g/ mL}$ | 500 $\mu\text{g/ mL}$ | 1250 $\mu\text{g/ mL}$ | | | |
| Absorbancia | 0.045 | 0.049 | 0.485 | 0.053 | | | |

Tabla 8. Absorbancias de controles y muestras para el ensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

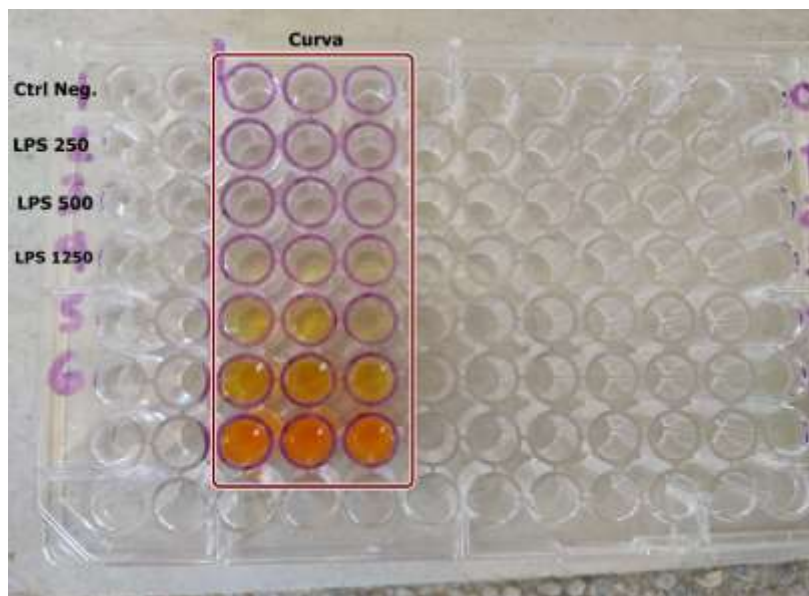


Figura 19. Placa de ELISA con sobrenadante de las muestras de las 3 concentraciones de LPS.

Técnica para la detección de productos fluorescentes

Al no observar la reacción de TBARS con los productos finales de la peroxidación de lípidos, se llevó a cabo la técnica para la detección de productos fluorescentes con el apoyo del Dr. Antonio Monroy investigador de la Facultad de Farmacia.

Se utilizaron las mismas condiciones y concentraciones de LPS para causar el daño, posteriormente se homogenizó el tejido en 3 mL de agua desionizada, por duplicado, se tomó 1 mL del homogenado al que se agregaron 4 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v / v). Los tubos protegidos de la luz se agitaron por 2 min después de los cuales se colocaron en hielo durante 30 minutos para permitir la separación de fases. La fase acuosa se desechó mientras que 2 mL de la capa clorofórmica se colocó en una cubeta de cuarzo donde se añadió 0.2 mL de metanol. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó a 140 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina (0.1 mg/L) preparado en solución de ácido sulfúrico (0.05 M). Se tomaron 4 lecturas las cuales se promediaron para poder determinar las unidades de fluorescencia por gramo de proteína. Finalmente se realizó la técnica de Lowry para determinar los g de proteína de los homogenizados, al realizar la comparación de las muestras con el control negativo (sin daño), no se observó diferencia en las unidades de fluorescencia (tabla 9) (Aguirre *et al.* 2017).

| No. | Promedio | Promedio-Blanco | Ajuste Quinina | g de proteína | UF/g de tejido |
|----------|-----------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
| C | 24.37575 | 17.49475 | 30.90457714 | 0.003291 | 9390.634197 |
| LPS 250 | 20.679375 | 13.798375 | 24.37490931 | 0.00324 | 7523.120157 |
| LPS 500 | 23.451125 | 16.570125 | 29.27122173 | 0.003748 | 7809.824367 |
| LPS 1250 | 21.89275 | 15.01175 | 26.51834327 | 0.003596 | 7374.400242 |

Tabla 9. Absorbancias de controles y muestras para el ensayo de productos fluorescentes.

Estandarización del modelo de daño con Ácido valproico

Debido a que no se logró observar daño en las muestras utilizando LPS, se realizó un nuevo modelo de daño con ácido valproico, ya que existen reportes que este fármaco anticonvulsivo a altas concentraciones es tóxico (Chaudhary y Parvez 2012). Se homogenizo el cerebro en buffer de fosfatos de sodio a un pH 7.4. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 750g x 10 min y al sobrenadante se le agrego 1 mL de ácido valproico utilizando dos concentraciones 1 y 10 mg/mL, se incubaron las preparaciones en baño maría a 37°C durante 3 horas. Finalmente se realizó la técnica de TBARS, observando que la respuesta fue igual a los ensayos anteriores

con LPS, no hubo cambio en las absorbancias de las muestras de daño con respecto al control negativo.

| VPA | Control negativo | Control positivo | 1 mg/ mL | 10 mg/ mL |
|-------------|------------------|------------------|----------|-----------|
| Absorbancia | 0.052 | 0.059 | 0.62 | 0.0655 |

Tabla 10. Absorbancias utilizando el modelo de daño con VPA



Figura 20. Placa de ELISA con sobrenadante de TMPO (amarillo, curva) y muestras (blanco) del ensayo de TBARS.

Alternativas

- Se mandó un alícuota del stock de LPS al Lab. 21 del IBT edificio norte, para comprobar si el LPS con el que se están realizando los ensayos tiene la capacidad de causar el daño, esto se realizará mediante un ensayo con macrófagos que se tiene estandarizado en este laboratorio.
- Se realizará una prueba de daño con óxido nítrico en macrófagos con apoyo de la Dra. Vera Petricevich en la Facultad de Medicina.

Discusión Preliminar

La gliosis reactiva y la neuroinflamación son características de diversas enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica, Demencia temporal frontal y Epilepsia, en las cuales se pueden observar procesos neurodegenerativos. La microglía es un factor importante en las vías de activación del proceso en el cual existe la pérdida de células neuronales, dado que su función principal es mantener la homeostasis en el cerebro, activándose rápidamente ante cambios patológicos en el sistema nervioso central, tales como inflamación, isquemia, trauma y tumores (Salter y Stevens 2017).

Recientemente, se han realizado estudios con productos naturales y sus componentes para la búsqueda de nuevas alternativas que permitan inhibir la activación microglial neurotóxica, y de esta manera establecer nuevas estrategias terapéuticas que disminuyan o eliminen los efectos secundarios de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Dmitri *et al.* 2017 demostraron que el compuesto securinina aislado de *Securinega suffruticosa* presenta propiedades neuroprotectoras ya que inhibe la activación de células gliales y la subsecuente generación de factores pro-inflamatorios. Resultados semejantes se pudieron observar en el estudio realizado por Castro-García 2017 en el cual se utilizaron los metabolitos secundarios escamonina I y tiriantina C aislados de *Ipomoea tyrianthina* en donde se observó la disminución de la activación astrocítica, alteraciones neuronales (neurodegeneración), y el edema intersticial principalmente en el área del giro dentado y CA3 del hipocampo. De acuerdo a lo reportado en estudios anteriores y a lo analizado en nuestros resultados se puede sugerir que escamonina I, puede fungir como agente antiinflamatorio, dado que se pudo observar una disminución en la inmunorreactividad de mediadores pro-inflamatorios (IL1- β , TNF- α e IL-6) al someterse a un pre-tratamiento con el compuesto, así como disminución de edema intersticial. Lo cual puede sugerir que dicho compuesto puede interferir en la activación de las células gliales principalmente de la microglía, y por ende se pueda observar la disminución de las citocinas pro-inflamatorias.

Los metabolitos secundarios de plantas son de gran interés debido a sus propiedades farmacéuticas y sus aplicaciones terapéuticas en el campo médico, actualmente existe la búsqueda de nuevos compuestos que permitan inhibir o mitigar problemas de salud crónicos como son las condiciones neurodegenerativas, cardiovasculares o enfermedades inflamatorias, las cuales se encuentran asociadas al daño provocado por el estrés oxidativo el cual ha sido confirmado que contribuye con la patogénesis y fisiopatología de estas enfermedades. Se han realizado estudios que confirman que pacientes con Alzheimer presentan algunos marcadores del estrés oxidativo (malondialdehído producto final de peroxidación

lipídica) además de observarse oxidación de ADN y proteínas (Pisoschi 2015). Tung *et al.* 2017 determinaron que el extracto obtenido de la raíz del jengibre presentaba actividad antioxidante con una IC_{50} 8.89 $\mu\text{g/ml}$, sugiriendo que dicho efecto podría depender a la cantidad de fenoles encontrados en el mismo. Otro estudio realizado por Padmapriya *et al.* 2017 con extractos obtenidos de hojas, raíz, semillas y tallo de *Thephrosia purpurea* indicó que las hojas y la raíz presentaban una mayor actividad de captura del radical DPPH con una IC_{50} 186 y 276.7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, estos mismos extractos presentaron actividad citotóxica contra células de cáncer colonrectal. Oluwayinka *et al.* 2018 determinaron el potencial antioxidante y antiinflamatorio de *Feretia apodanthera*, realizaron el análisis de diversos extractos sin embargo determinaron que el extracto de etanol (IC_{50} 0.0053 mg/mL) y agua (IC_{50} 0.0064 mg/mL) presentaban el mejor potencial antioxidante, reportaron que la concentración de 80 mg/mL tenía el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH por el extracto etanólico. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que el compuesto aromático obtenido del extracto de *Ipomoea tyrianthina* presenta una actividad antioxidante prometedora ya que cantidades menores del compuesto permite contrarrestar el estrés oxidativo, esto debido a que la concentración 40 $\mu\text{g/ml}$ inhibe casi el 50% del radical DPPH, resultado semejante a lo reportado por Oluwayinka *et al.* 2018, con lo cual se puede sugerir que este compuesto podría retrasar o prevenir la sobreproducción de radicales libres en el cerebro debido a agentes tóxicos, daños o sobreactivación de las células gliales, evitando así el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Conclusión Preliminar

- Escamonina I aislada de *Ipomoea tyrianthina* a dosis de 80 mg/Kg disminuye el edema intersticial y la expresión de interleucinas pro-inflamatorias (IL1- β , IL-6 y TNF- α) al realizar un estímulo de daño con PTZ.
- Escamonina I no presenta la capacidad de donar electrones o H, a radicales libres.
- El Compuesto aromático a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ puede reducir un 48.16% al radical DPPH, determinando su actividad antioxidante, la cual tendrá una relación proporcional a la concentración del compuesto que se utilice.

CALENDARIO DE ACTIVIDADES

| | Semestre 1 | | | | | | Semestre 2 | | | | | | Semestre 3 | | | | | | Semestre 4 | | | | | |
|--|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | AGO | SEP | OCT | NOV | DIC | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY | JUN | JUL | AGO | SEP | OCT | NOV | DIC | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY | JUN | JUL |
| Bioquímica | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Biología molecular | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tutorial 1 | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bioestadística | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Comunicación celular | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Ensayo obtención de cerebro | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | |
| Cortes histológicos de cerebro y preparación de laminillas | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | |
| Ensayo Inmunohistoquímico prueba | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | |
| Análisis de laminillas en microscopio | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | |
| Tutorial 2 | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | |
| Estandarización técnica ELISA | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | |
| Liberación de mediadores pro-inflamatorios | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | |
| Medición de mediadores pro-inflamatorios | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | |
| Ensayo Inmunohistoquímico | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | |
| Tutorial 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | |
| Actividad Antioxidante | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | |
| Análisis estadístico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | | |
| Tutorial 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | |

REFERENCIAS

- Abarca, C. 2000. Liberación de los ácidos glutámico y gamma aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso de acocil y ratón por efecto de la fracción tóxica del veneno de la escolopendra (*Scolopendra* sp.). CEIB-UAEM (Tesis de maestría).
- Aguirre, A., Villeda, J., Campos, V., Herrera, M., Montiel, E., Tello, I., Del río, F., Rodríguez, V., León, I. 2013. Anticonvulsant and neuroprotective effects of oligosaccharides from lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*. 15. 555-568.
- Carranza, E. 2007. Flor del bajío y regiones adyacentes Familia Convolvulaceae. Instituto de ecología A.C. Centro regional del bajío Pátzcuaro, Michoacán. 1-99.
- Castañeda, J., Charry, A., Pereda, R. 2013. Empleo de métodos analíticos modernos para el aislamiento y la identificación de resinas glicosídicas de la Familia Convolvulaceae. *Revista de investigaciones Universidad del Quindío*. 24. 19-29.
- Castro, J. 2011. Mecanismo de acción de tiriantina I y ácido tiriantínico II aislados de *Ipomoea tyrianthina* Lindley sobre el sistema GABAérgico en corteza cerebral de ratón. CEIB-UAEM (Tesis de maestría).
- Chérigo, L., Pereda, R., Fragoso, M., Jacobo, N., Kaatz, G., Gibbons, S. 2008. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products*. 71. 1037-1045.
- Cuenca, M., Brea, D., Segura, T., Galindo, M., Antón, D., Agulla, J., Castillo, J., Jordán, J. 2010. La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Rev Neurol*. 50. 349-359.
- García de Lorenzo, A., Martínez, J., Sánchez, M. 2000. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina intensiva*. 24. 353-360.
- González, E., Carretero, M., Gómez, M., Cuadrado, S. 2014. Estudio de la actividad neuroprotectora de diterpenos aislados del género *Sideritis*. *An. Real Acad. Farm.* 80. 362-376.
- Haines D.E. 2003. Principios de neurociencia; 2da edición. Elsevier science and Churchil livingstone.

- Hyang, C., Ji-Myung, K., Eun, C., Namsoo, C. 2008. Neuroprotective effects of several Korean medicinal plants traditionally used for stroke remedy. *Journal of Medicinal Food*. 11. 246-251. Doi: 10.1089/jmf.2007.542.
- Jie, L., Jie, P., Yong, Y. 2016. Two novel resin glycosides isolated from *Ipomoea cairica* with α -glucosidase inhibitory activity. *ELSEVIER*. 227-231.
- Kattenmann, H., Hanish, U., Noda, M., Verkhatsky, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 91. 461-553. Doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- Koshinaga, M., Katayama, Y., Fukushima, M., Oshima, H., Suma, T., Takahata, T. 2000. Rapid and widespread microglial activation induced by traumatic brain injury in rat brain slices. *Journal of neurotrauma*. 17. 185-192.
- Landry, R., Jacobs, V., Romero, E., DeLeo, J. 2012. Propentofylline, a CNS glial modulator does not decrease pain in post-herpetic neuralgia patients: In vitro evidence for differential responses in human and rodent microglia and macrophages. *ELSEVIER*. 234. 340-350. Doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.006
- León, I., Castro, J., Mirón, G., Del Río, F., Enríquez, R., Reynolds, W., Estrada, S., Rendón, P., Gutiérrez, M., Herrera, M., Mendoza, A., Vargas, G. 2014. Resin glycosides from *Ipomoea tyrianthina* and their sedative and vasorelaxant effects. *J Nat Med*. Doi: 10.1007/s11418-014-0844-x.
- León, I., Herrera, M., Estrada, S., Gutiérrez, M., Martínez, I., Navarrete, G., Ríos, M., Aguilar, B., Castillo, P., Aguirre, Alma. 2011. Sedative, vasorelaxant and cytotoxic effects of convolvulin from *Ipomoea tyrianthina*. *ELSEVIER*. 135. 434-439. Doi:10.1016/j.jep.2011.03.041
- León, I., Mirón, G., Estrada, S., Aguirre, F., Gutiérrez, M., Molina, G., Hurtado, G., Navarrete, G., Montiel, E. 2009. Glycolipid ester-type heterodimers from *Ipomoea tyrianthina* and their pharmacological activity. *ELSEVIER*. 19. 4652-4656. Doi: 10.1016/j.bmcl.2009.06.087.
- León, I., Mirón, G., Moina, G., Herrera, M., Estrada, S., Gutiérrez, M., Alonso, D., Navarrete, G., Ríos, M., Said, Salvador. 2008. Tyrianthinic acids from *Ipomoea tyrianthina* and their antimycobacterial activity, cytotoxicity and effects on the Central Nervous System. *Journal of Natural Products*. 71. 1686-1691.
- León, I., Villeda, J., Campos, V., Aguirre, A., Estrada, S., Navarrete, G., Ríos, Y., Aguilar, B., Castillo, P., Rivera, J. 2014. Evaluation of the neuroprotective activity of stansin 6, a resin glycoside from *Ipomoea stans*. *ELSEVIER*. 30. 1-5.

- Yuan, L., Liu, S., Bai, X., Gao, Y., Liu, G., Wang, X., Liu, D., Li, T., Hao, A., Wang, Z. 2016. Oxytocin inhibits lipopolysaccharide induced inflammation in microglial cells and attenuates microglial activation in lipopolysaccharide-treated mice. *Journal of neuroinflammation*. 13. 1-17. Doi: 10.1186/s12974-016-0541-7
- Meira, M., Pereira, E., David, J., David, J. 2012. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of pharmacognosy*. 22. 682-713.
- Mirón, G., Herrera, M., Estrada, S., Aguirre, F., Vázquez, L., León, I. 2007. Resin glycosides from the roots of *Ipomoea tyrianthina* and their biological activity. *Journal of Natural Products*. 70. 557-562.
- Nillert, N., Pannangrong, W., Umka, J., Chaijaroonkhanarak, W., Sripanidkulchai, K., Sripanidkulchai, B. 2017. Neuroprotective effects of aged garlic extract on cognitive dysfunction and neuroinflammation induced by β -amyloid in rats. *Nutrients*. 9. 1-13. Doi: 10.3390/nu9010024.
- Noda, N., Kogetsu, H., Kawasaki, T., Miyahara, K. 1990. Scammonins I and II, the resin glycosides of *radix scammoniae* from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*. 29. 3565-3569.
- Pereda, R., Rosas, D., Castañeda, J. 2010. Resin glycosides from the Morning Glory Family. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 92. 77-86. Doi: 10.1007/978-3-211-99661-4_2
- Reséndiz, J., Camarena, A., Pérez, G., Falfán, R. 2011. Mecanismos inmunológicos de la respuesta inflamatoria en EPOC. *Neumol Cir Torax*. 69. 210-217.
- Salemme, A., Togna, A., Mastrofrancesco, A., Camisotto, V., Ottaviani, M., Bianco, A., Venditi, A. 2016. Anti-inflammatory effects and antioxidant activity of dihydroasparagusic acid in lipopolysaccharide-activated microglial cells. *ELSEVIER*. 120. 151-158.
- Sheeja, D., Beema, R., Karutha, S., Pandima, P. 2016. Cholinesterase inhibitory, anti-amyloidogenic and neuroprotective effect of the medicinal plant *Grewia tiliaefolia*- An in vitro and silico study. *Pharmaceutical biology*. 55. 381-393.
- So, A., De Smedt, T., Revaz, S., Tschopp, J. 2007. A pilot of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis research and therapy*. 9. 2-6.

- Twinomujuni, S., Oloro, J., Alele, P. 2016. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the leaf aqueous and ethanolic extracts of *Melanthera scandens* in rat model. *Afr Pharm Pharmacol.* 10. 216-222. Doi: 10.5897/AJPP2015.4488.
- Vidal, M., Montezano, I., Magalhaes, M., Lopes, R., Avelar, X., Humberto, J. 2016. Neuroprotective effect of Sapucaia nuts (*Lecythis Pisonis*) on rats fed with high-fat diet. *Nutr Hosp.* 33. 1424-1429. Doi: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.805>.
- Wohleb, Eric. 2016. Neuron-Microglia interactions in mental health disorders: "For better, and for worse". *Frontiers in immunology.* 7. 1-13. Doi: 10.3389/fimmu.2016.00544.
- Yong, W., Yuan, Z., Jun, L., Guo, C., Xiao, W., Jie, F., Jie, R., Xiao, S., Chun, L., Qiu, S. 2010. Purple sweet potato color suppresses lipopolysaccharide-induced acute inflammatory response in mouse brain. *ELSEVIER.* 56. 424-430. Doi: 10.1016/j.neuint.2009.11.016.