



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Biotecnología

**Evaluación *in vitro* del efecto del extracto metanólico y
tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la
liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de
cerebro de ratón**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

L. F. Edgar Vicente Rodríguez Wilson

Director:

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte

Cuernavaca, Morelos; 2020

I. Índice

I.	Índice	I
II.	Abreviaturas	III
III.	Lista de Figuras	IV
IV.	Lista de gráficas	IV
V.	Lista de tablas	V
VI.	Resumen	VI
1	Introducción	1
2	Antecedentes	3
	2.1 Sistema nervioso central	4
	2.1.1 Células del sistema nervioso central	5
	2.1.2 La neurona	5
	2.2 Comunicación celular	6
	2.2.1 Potencial de acción	6
	2.3 La sinapsis	7
	2.3.1 Sinapsis química	7
	2.4 Neurotransmisores	9
	2.4.1 Acetilcolina	9
	2.4.2 Monoaminas	9
	2.4.2.1 Dopamina	10
	2.4.2.2 Norepinefrina	10
	2.4.2.3 Epinefrina	10
	2.4.2.4 Serotonina	11
	2.4.2.4.1 Serotonina como neuromodulador	11
	2.4.3 Neurotransmisores aminoacídicos	12
	2.4.3.1 Glutamato y aspartato	12
	2.4.3.2 GABA y glicina	13
	2.4.3.2.1 Importancia fisiológica de GABA	13
	2.4.4 Péptidos	14
	2.5 Importancia farmacológica de la sinapsis química	14
	2.5.1 Sinaptosomas como modelo de estudio	15
	2.6 Uso de herbolaria como tratamiento para trastornos neurológicos	16
	2.7 Flavonoides: biosíntesis, clasificación y efectos farmacológicos	17
	2.8 <i>Agastache mexicana</i> , una especie rica en flavonoides	20
	2.8.1 Antecedentes directos de <i>A. mexicana</i> y tilianina	21
3	Justificación	23

4	Hipótesis	25
5	Objetivos	27
	5.1 Objetivo general	28
	5.2 Objetivos específicos	28
6	Metodología	29
	6.1 Obtención de los extractos orgánicos de <i>Agastache mexicana</i>	30
	6.2 Modelo experimental	30
	6.3 Disección de cerebro y obtención de los sinaptosomas	30
	6.4 Experimentos de liberación y cuantificación de neurotransmisores	31
	6.5 Análisis estadístico	34
	6.6 Estrategia experimental	34
7	Resultados	35
	7.1 Obtención de sinaptosomas a partir de tejido neuronal de ratón	36
	7.2 Cuantificación de la liberación de neurotransmisores producido por diferentes concentraciones de EMAM	37
	7.3 Porcentaje de liberación de neurotransmisores con respecto al valor basal producido por diferentes concentraciones de EMAM	40
	7.4 Cuantificación de la liberación de neurotransmisores producido por una concentración de 100µg/ml de EMAM	42
	7.5 Porcentaje de liberación de neurotransmisores con respecto al valor basal producido por una concentración de 100µg/ml de EMAM	44
	7.6 Cuantificación de la liberación de neurotransmisores producido por diferentes concentraciones de tilianina	47
	7.7 Porcentaje de liberación de neurotransmisores con respecto al valor basal producido por diferentes concentraciones de tilianina	49
8	Discusión	52
9	Conclusión	57
10	Perspectivas	59
11	Bibliografía	61
12	Anexos	66

II. Abreviaturas

5-Hidroxitriptamina- serotonina	5-HT
Acetil Coenzima A	ACoA
Ácido Gama Aminobutírico	GABA
Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	AMPA
Adenosin Mono Fosfato cíclico	AMPc
Coenzima A	CoA
Colecistoquinina	CCK
Dihidroxifenilalanina	DOPA
Enfermedad de Alzheimer	EA
Extracto metanólico de <i>Agastache mexicana</i>	EMAm
Fenil etanolamina N-metil transferasa	PNMT
Guanosin Monofosfato cíclico	GMPC
Hormona adrenocorticotropa	ACTH
Malonil Coenzima A	MCoA
Miligramos	mg
Milisegundos	ms
Monoaminoxidasa	MAO
Monoaminoxidasa A	MAO-A
Monoaminoxidasa B	MAO-B
Nanómetros	nm
N-metil-D-aspartato	NMDA
Organización mundial de la Salud	OMS
Óxido nítrico	NO
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Nervioso Periférico	SNP

III. Lista de figuras	Página
Figura 1. Esquema general del sistema nervioso.	4
Figura 2. Esquema general de una sinapsis química.	8
Figura 3. Imagen de un sinaptosoma a 8000X.	16
Figura 4. Estructura básica del esqueleto de los flavonoides y sus clases.	18
Figura 5. Estructura química de tilianina.	21
Figura 6. Modelo farmacofórico de tilianina y diazepam.	22
Figura 7. Fotomicrografía de sinaptosomas.	36
Figura 8. Cromatograma obtenido a partir de HPLC con detector de fluorescencia.	37
IV. Lista de gráficas	
Gráfica 1. Liberación de distintos neurotransmisores a condiciones control (ensayo 1).	38
Gráfica 2. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de EMAM (10 y 50 µg/ml).	39
Gráfica 3. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de EMAM (100µg/ml).	39
Gráfica 4. Porcentaje de liberación de ácido glutámico con respecto a la concentración basal.	40
Gráfica 5. Porcentaje de liberación de GABA con respecto a la concentración basal.	41
Gráfica 6. Porcentaje de liberación de serotonina con respecto a la concentración basal.	41
Gráfica 7. Liberación de distintos neurotransmisores a condiciones control (ensayo 2).	42
Gráfica 8. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de EMAM (100µg/ml).	43
Gráfica 9. Porcentaje de liberación de ácido glutámico con respecto a la concentración basal.	44
Gráfica 10. Porcentaje de liberación de GABA con respecto a la concentración basal.	45
Gráfica 11. Porcentaje de liberación de serotonina con respecto a la concentración basal.	46
Gráfica 12. Liberación de distintos neurotransmisores a condiciones control (ensayo 3).	47
Gráfica 13. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de tilianina (0.022µM).	48

Gráfica 14. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de tilianina (0.055 μ M).	48
Gráfica 15. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de tilianina (0.11 μ M).	49
Gráfica 16. Porcentaje de liberación de ácido glutámico con respecto a la concentración basal.	50
Gráfica 17. Porcentaje de liberación de GABA con respecto a la concentración basal.	50
Gráfica 18. Porcentaje de liberación de serotonina con respecto a la concentración basal.	51
Gráfica 19. Curva estándar de ácido glutámico.	67
Gráfica 20. Curva estándar de GABA.	67
Gráfica 21. Curva estándar de serotonina.	68

V. Lista de tablas

Tabla 1. Composición de los medios basal y de liberación.	31
Tabla 2. Condiciones experimentales.	32
Tabla 3. Preparación de muestras para el HPLC.	33
Tabla 4. Programa de gradiente para el HPLC.	33

Resumen

Desde la antigüedad diversas civilizaciones han descrito el uso de plantas medicinales; extractos obtenidos a partir de estas plantas han sido fuente de compuestos bioactivos que han mostrado gran variedad de efectos terapéuticos; en este sentido, *Agastache mexicana* es una planta que se ha utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional mexicana para tratar la ansiedad, el insomnio y el dolor entre otras afecciones. Estudios recientes han demostrado que el extracto metanólico (EMAm) de esta especie tiene un efecto ansiolítico y sedante observado de manera conductual, relacionado a uno de sus principales compuestos químicos, la tilianina. Por lo cual, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto producido por el extracto metanólico y la tilianina obtenidos de *Agastache mexicana*, sobre la liberación *in vitro* de los neurotransmisores GABA y serotonina, utilizando como modelo experimental sinaptosomas obtenidos a partir de cerebro de ratones (*Mus musculus*) jóvenes (2 meses de edad) cepa CD-1. Para evaluar la liberación de neurotransmisores, se realizó la perfusión de sinaptosomas a diferentes condiciones experimentales, partiendo de una concentración de 10 µg/ml de EMAm y 0.022 µM de tilianina. Para finalizar, se observó un aumento sobre la liberación de serotonina a partir de una concentración de 100µg/ml de EMAm, así mismo a una concentración de 0.022 µM y 0.055 µM de tilianina; con base en esto, se propone a tilianina como uno de los compuestos presentes en el EMAm, responsable de la liberación de serotonina relacionada a la actividad ansiolítica de *Agastache mexicana*.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

En la actualidad los trastornos neurológicos como la ansiedad y depresión son dos de las enfermedades crónicas que más afectan a la población joven y adulta, llegando a interferir en su estilo de vida, relaciones personales, inclusive llegando a ser causa de suicidio. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que para el año 2030 dichos trastornos neurológicos serán causa importante de muerte a escala mundial, representando un 12.22% del total de muertes.

Hoy en día, las instituciones de salud promueven programas para mejorar el estilo de vida de la población, fomentado el ejercicio y la buena alimentación, además, de otorgar ayuda médica y psicológica a pacientes con trastornos neurológicos. Aún con los programas que se han implementado, una gran parte de la población que padece dichas enfermedades continúa susceptible a la sintomatología de éstas; por lo que constantemente, la investigación clínica se encuentra en la búsqueda de agentes novedosos para el tratamiento de estas afecciones.

Desde la antigüedad, los productos naturales, han sido fuente de compuestos bioactivos, donde diversos extractos obtenidos de plantas han mostrado gran variedad de efectos terapéuticos. *Agastache mexicana* es una especie que ha sido foco de estudio gracias a sus efectos terapéuticos relacionados con el sistema circulatorio; estudios recientes han demostrado que el extracto metanólico de esta especie tiene un efecto ansiolítico y sedante relacionado a uno de sus principales compuestos químicos, tilianina.

Por lo anterior, es de interés continuar con las investigaciones previamente realizadas en esta especie, mediante la utilización de sinaptosomas para identificar un posible efecto de liberación de neurotransmisores de tipo inhibitorio a nivel de sistema nervioso central; relacionado a un efecto ansiolítico.

ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1 Sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) está constituido por el encéfalo y la médula espinal, el encéfalo a su vez se constituye por el cerebro, cerebelo y el tronco encefálico; además se encuentra protegido por los huesos del cráneo (**Figura 1**). El SNC está organizado en niveles jerárquicos, el nivel más alto es la corteza cerebral, en la cual se localizan las funciones superiores del Sistema Nervioso Central, como la percepción consciente, la memoria y el razonamiento lógico. Debajo de la corteza cerebral se encuentran otras estructuras que ajustan de forma inconsciente los detalles de los movimientos, por ejemplo, el cerebelo y los ganglios basales. El hipotálamo por su parte integra las vías sensitivas y las vías motoras, para precisar y controlar las órdenes que la corteza cerebral envía al aparato locomotor. Más abajo se encuentra el tronco del encéfalo, se encarga de controlar el equilibrio en la posición erecta, mantenimiento de la presión arterial, y movimientos autónomos como la respiración. Por último, se encuentra la médula espinal, que se encarga de controlar los movimientos como el caminar, o responder a algún estímulo doloroso (Peters, 1978).

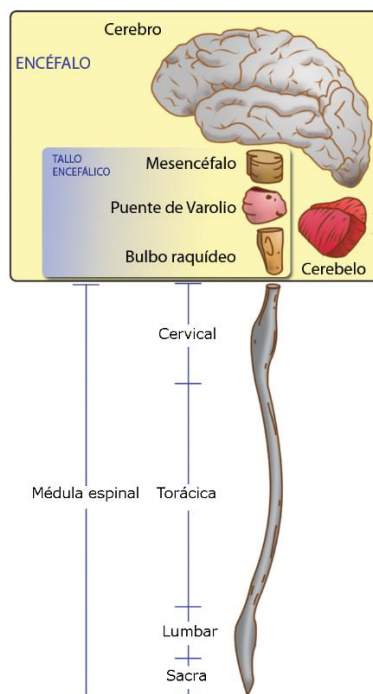


Figura 1. Esquema general del sistema nervioso central (modificado de Snell, 2003).

2.1.1 Células del sistema nervioso central

Las células que forman el tejido nervioso pertenecen a dos categorías, neuronas y células de sostén (células gliales); la macroglía y la microglía, guardan estrecha relación con las neuronas, se localizan en todos los sectores del tejido y son las más abundantes (Escobar y Pimienta, 2006).

2.1.2 La neurona

Las neuronas son las células responsables de las funciones atribuidas al sistema nervioso: pensar, razonar, control de la actividad muscular y sentir. Son células excitables que conducen impulsos que hacen posible todas las funciones antes descritas. Representan la unidad básica funcional y estructural del sistema nervioso, en el encéfalo humano se encuentran alrededor de 100,000 millones de neuronas (Escobar y Pimienta, 2006).

Aunque pueden tener distintas formas y tamaños, todas las neuronas tienen una estructura básica y constan de 3 partes esenciales: cuerpo neuronal, dendritas y axones.

El cuerpo o soma neuronal contiene el núcleo y el citoplasma, con todos sus orgánulos intracelulares, rodeado por la membrana plasmática.

Las dendritas son prolongaciones cortas ramificadas, en general múltiples, a través de las cuales la neurona recibe estímulos procedentes de neuronas vecinas con las cuales establece una sinapsis o contacto intercelular (Palay y webster, 1978).

El axón es una prolongación, generalmente única de longitud variable a través de la cual el impulso nervioso se transmite desde el cuerpo celular a otras células nerviosas o a otros órganos del cuerpo. Cerca del final, el axón, se divide en terminaciones especializadas que contactaran con otras neuronas u órganos efectores.

El lugar de contacto entre dos neuronas o entre una neurona y un órgano efector es una sinapsis. Para formar la sinapsis, el axón de la célula presináptica se ensancha formando los bulbos terminales o la terminal presináptica, los cuales contienen sacos membranosos diminutos, llamados vesículas sinápticas, que almacenan un neurotransmisor químico. La célula postsináptica posee una superficie receptora o terminal postsináptica. Entre las dos terminales existe un espacio que las separa llamado hendidura postsináptica (Peters, 1978).

2.2 Comunicación celular

La comunicación celular es la capacidad que tienen todas las células de intercambiar información fisicoquímica con el medio ambiente y con otras células. Es un mecanismo homeostático que tiene como objetivo mantener las condiciones fisicoquímicas internas adecuadas para la vida frente a los cambios externos; puede ser establecida de distintas formas que incluyen: **a) la comunicación paracrina:** la señal actúa sobre células vecinas; **b) endocrina:** la señal viaja por el torrente sanguíneo y alcanza células lejanas; **c) autocrina:** la señal llega a la misma célula de la cual salió; **d) neurotransmisión o transmisión sináptica:** la señal es liberada por la célula emisora al espacio sináptico, donde es capturada por la célula receptora; **e) contactos célula-célula:** la señal permanece anclada a la membrana de la célula emisora mientras interactúa con la célula receptora (Guyton 2016).

2.2.1 Potencial de acción

El potencial de acción o impulso eléctrico es una onda de descarga eléctrica que viaja a lo largo de la membrana celular modificando su distribución de carga eléctrica. Los potenciales de acción se utilizan en el cuerpo para llevar información entre unos tejidos y otros, lo que hace que sean una característica microscópica esencial para la vida. Las células del tejido nervioso lo utilizan para enviar mensajes entre células nerviosas o desde células nerviosas a tejidos corporales como músculo o glándulas. Los potenciales de acción son la vía fundamental de transmisión de códigos neurales (Guyton 2016).

Siempre existe una diferencia de potencial entre la parte interna y la parte externa de la membrana celular (por lo general de -70mV), esto se debe a los iones que existen en ambos lados de la membrana (sodio, potasio, magnesio, hidrógeno y cloro). Para llevar a cabo la despolarización de la membrana, un estímulo abre los canales de sodio. Dado que existe más sodio en el exterior que en el interior, este ingresa a la célula, cuando el potencial de membrana de una célula excitable se despolariza más allá de un cierto umbral (de -65mV a -55mV) se libera el impulso eléctrico; cuando el potencial de acción llega a una sobreexcitación (40mV) los canales de potasio se abren y se libera potasio hacia el exterior, revirtiendo la despolarización, lo cual logra que el potencial de acción vuelva aproximadamente a -70mV (reposo) (Guyton 2016).

2.3 La sinapsis

La sinapsis (unión estrecha) es la estructura a través de la cual una neurona se comunica con otra o con los efectores, como es el caso de la sinapsis neuromuscular. Existen dos tipos de sinapsis, la eléctrica y la química (Peters, 1978).

2.3.1 Sinapsis química

En este tipo de sinapsis se requiere de la liberación de una sustancia a la que se le denomina neurotransmisor. Existen diferencias morfológicas entre los procesos que intervienen en el contacto. La membrana presináptica es aquella que pertenece a la célula que transmite la información, utilizando un mediador químico o neurotransmisor y una membrana postsináptica de la célula que recibe el contacto y contiene un gran número de receptores afines al mediador químico. Las membranas están separadas por un espacio mínimo (200\AA) denominado hendidura sináptica solo reconocible con el microscopio electrónico. Las membranas y la hendidura están aisladas por el medio intercelular y por una envoltura, conformada por los procesos de los astrocitos. El hecho más conspicuo de la membrana presináptica es la presencia de vesículas que varían en su morfología, desde la esférica hasta la cilíndrica, dependiendo del tipo de sinapsis y aun del tipo de preparación del tejido. El tamaño de estas vesículas oscila entre 40 y 50nm, contienen el neurotransmisor y se acumulan preferencialmente en algunos sitios de la membrana presináptica denominados zonas activas (Escobar y Pimienta, 2006) (**Figura 2**).

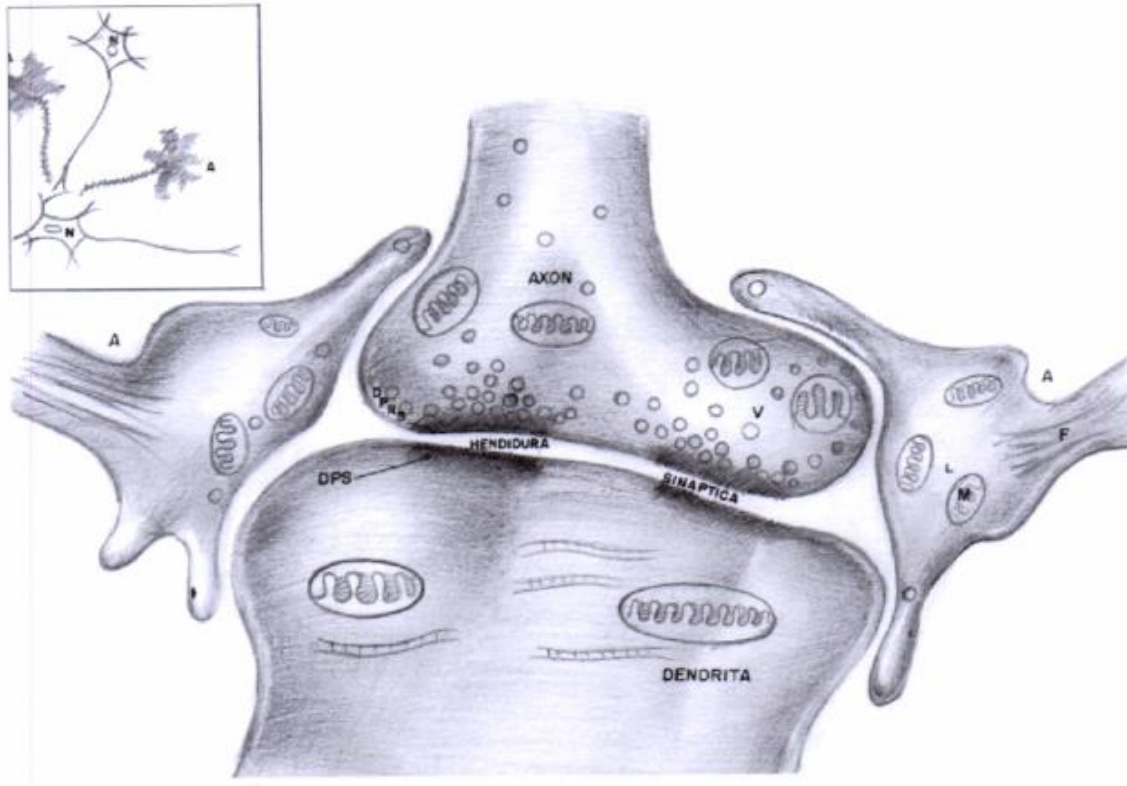


Figura 2. Esquema general de una sinapsis química (tomado de Escobar y pimienta, 2006).

En el recuadro (superior izquierdo) se esquematiza el contacto sináptico entre el axón de una neurona y la dendrita de otra, así como los procesos de las células gliales adyacentes. En la ampliación se indican los elementos que integran la sinapsis química. La membrana presináptica corresponde a una terminal axónica y contiene las vesículas con el neurotransmisor, que se libera a la hendidura sináptica. La membrana postsináptica puede corresponder a la superficie de una dendrita o al soma neuronal. El contacto sináptico está rodeado por procesos de los astrocitos que circundan el área.

A: Astrocito N: Neurona D: Dendrita DPS: densidad presináptica DPS: Densidad postsináptica
F: Filamentos

2.4 Neurotransmisores

Un neurotransmisor es una biomolécula que permite la neurotransmisión, es decir, la transmisión de información desde una neurona hacia otra, una célula muscular o una glándula, mediante la sinapsis que los separa. Los neurotransmisores son liberados desde las vesículas sinápticas en la extremidad de la neurona presináptica, hacia la sinapsis, atraviesa el espacio sináptico y actúa sobre los receptores celulares específicos de la célula objetivo. Para considerar una sustancia como neurotransmisor debe cumplir los siguientes criterios: Debe estar presente en neuronas o en células que deben poseer enzimas para su síntesis, así como localizarse regionalmente en grupos neuronales particulares. Deben existir mecanismos para la liberación de esta sustancia en las terminales sinápticas y que la liberación sea posible por estímulos eléctricos o por la aplicación de calcio a la terminal presináptica. Por último, deben existir receptores específicos para ellas, así como mecanismos para su hidrólisis e inactivación; teniendo en cuenta que la acción del neurotransmisor tiene que ser limitada en el tiempo (Escobar, 2006).

2.4.1 Acetilcolina

Fue la primera sustancia reconocida como un neurotransmisor, actúa como tal en el sistema nervioso central y en el periférico. Se encuentra presente en neuronas que poseen la enzima colinacetiltransferasa, la cual lleva a cabo su síntesis a partir de colina y acetil CoA. Es producida por motoneuronas craneales y espinales que inervan la musculatura esquelética. Se han identificado dos tipos de receptores colinérgicos: nicotínicos y muscarínicos, los cuales incluyen varios subtipos M1, M2, M3, M4 y M5. La acción nicotínica es ionotrófica y la muscarínica es metabotrófica mediada por GMPc (Escobar, 2006).

2.4.2 Monoaminas

Entre los neurotransmisores identificados se incluyen las monoaminas; estas se caracterizan por su amplia distribución en el sistema nervioso central y en el periférico, su facilidad para ser identificados por métodos fluorescentes, su presencia en axones de aspecto varicoso y su influencia sobre la atención, el estado de ánimo y la función visceral.

Este tipo de neurotransmisores, son degradados mediante las monoaminoxidasas, enzimas presentes en nuestro organismo y que catalizan la oxidación de este tipo de neurotransmisores. Existen dos tipos de monoaminoxidasas; MAO-A (degrada serotonina,

norepinefrina, epinefrina y dopamina) y MAO-B (degrada feniletilamina y dopamina), ambas se encuentran unidas a la membrana externa de la mitocondria en la mayoría de los tipos celulares del organismo (Utan, 2016).

Debido al papel clave que las MAO desempeñan en la inactivación de los neurotransmisores, las disfunciones de la MAO (por exceso o defecto de actividad) se piensa que es responsable de algunos trastornos neurológicos. Por ejemplo, se ha asociado a niveles inusualmente altos o bajos de MAO en el organismo a la depresión, el abuso de sustancias, el trastorno por déficit de atención y una madurez sexual irregular.

2.4.2.1 Dopamina

La dopamina es sintetizada a partir de la tiroxina, por medio de la enzima tirosina hidroxilasa; la síntesis ocurre en las terminales sinápticas y se almacena en vesículas. Se han identificado cinco tipos de receptores dopaminérgicos denominados desde D1 a D5. El principal sitio de localización de neuronales dopaminérgicas es la sustancia negra compacta y su proyección a los núcleos de la base.

2.4.2.2 Norepinefrina

Se sintetiza a partir de la dopamina, reacción que es mediada por la enzima dopaminabetahidroxilasa. Se han identificado receptores alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 y beta 3. Se les localiza en neuronas posganglionares simpáticas, y en el locus coeruleus y la región lateral del tegmento pontino (Racefyn 2008).

2.4.2.3 Epinefrina

La epinefrina se sintetiza a partir de la norepinefrina por medio de la enzima fenil etanolamina N-metil transferasa (PNMT). Se localiza en el sistema nervioso simpático especialmente, y en algunas neuronas de la región lateral del bulbo. Esta sustancia activa los mismos receptores que la norepinefrina.

2.4.2.4 Serotonina

La serotonina (5-HT), es un neurotransmisor que se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC), está involucrado en una gran variedad de funciones fisiológicas. En varias regiones del cerebro, la 5-HT se libera de forma difusa por transmisión y se comporta como un neuromodulador en lugar de como un neurotransmisor “clásico”. En algunos casos la 5-HT se localiza en el mismo terminal nervioso con otros neurotransmisores y se producen interacciones recíprocas (Ciranna, 2006).

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) participa en la regulación de las funciones fisiológicas básicas, como la secreción de hormonas, el ciclo sueño-vigilia, el control motor, el funcionamiento del sistema inmunológico, la nocicepción, ingesta de alimentos y balance energético. Además, la 5-HT participa en funciones cerebrales superiores, como la cognición y los estados emocionales, modulando la plasticidad sináptica y, como se descubrió hace tiempo, la neurogénesis. Este neurotransmisor tiene al menos 14 receptores diferentes y es capaz de modificar los efectos producidos por la liberación de otros neurotransmisores como el GABA y el ácido glutámico (Ciranna, 2006).

La serotonina se sintetiza a partir del triptófano por medio de la enzima triptófano hidroxilasa. Se localiza especialmente en los núcleos del rafe y sus proyecciones a lo largo del encéfalo y la medula espinal. Se han identificado receptores 5HT1, 5HT2, 5HT3, 5HT4, 5HT5, 5HT6 y 5HT7, entre otros (Quentin, 2018).

2.4.2.4.1 Serotonina como neuromodulador

Se sabe que la serotonina (5-HT) está implicada en el procesamiento de la percepción, la emoción y las cogniciones, además de involucrarse en varios trastornos psiquiátricos. Varias líneas de evidencia implican a la serotonina en la regulación de los rasgos de personalidad y el control del estado de ánimo. De hecho, la serotonina también se ha implicado en la etiología de varios trastornos del estado de ánimo, incluidos los trastornos del espectro autista (TEA), el trastorno depresivo mayor (TDM), la esquizofrenia o el trastorno de bipolaridad (BD) y la ansiedad (Trueta, 2012).

La variación en los niveles de serotonina puede afectar el estado de ánimo y la motivación, un ejemplo claro es la ansiogénesis, relacionada a una disminución en la liberación de serotonina cerebral, así como la depresión, relacionada a niveles bajos de serotonina (Zangrossi, 2014).

Se dice que 5-HT modifica de manera diferente los efectos producidos por glutamato y GABA, actuando sobre distintos subtipos de receptores de 5-HT. A nivel presináptico puede modular la liberación de neurotransmisores: por ejemplo, en varias regiones del cerebro, la liberación de glutamato puede verse reducida mediante la interacción con receptores 5-HT_{1A} (Schimtz, 1995), del mismo modo ocurre con la liberación presináptica de GABA, la cual se puede ver inhibida por la interacción con receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} (Bardin, 2000), por otro lado, la interacción con receptores 5-HT₃, puede estimular la liberación de glutamato o GABA; se sabe que los receptores 5-HT₂ estimulan la liberación de GABA y pueden reducir la liberación de glutamato en distintas estructuras neuronales (Trueta, 2012).

2.4.3 Neurotransmisores aminoacídicos

Los neurotransmisores aminoacídicos están representados por glutamato, aspartato, ácido gamma aminobutírico (GABA) y glicina. Su aceptación como neurotransmisores ha presentado la dificultad de ser sustancias de amplia distribución, sin embargo, muchas neuronas las acumulan preferencialmente en sus terminales sinápticas. Además, se han demostrado para ellas acciones excitatorias e inhibitorias y diversos tipos de receptores (Möhler, 2009).

2.4.3.1 Glutamato y aspartato

Son aminoácidos que participan en contactos sinápticos de tipo excitatorio en la corteza cerebral, y otros sitios del sistema nervioso. Se localizan en las células de tipo piramidal y actúan en receptores de tipo ionotrófico como NMDA, kainato, AMPA. Se han identificado adicionalmente algunos receptores de tipo metabotróficos para glutamato. Por sí mismas estas sustancias en concentraciones elevadas en el medio intercelular o sináptico son neurotóxicas, por tanto, en condiciones normales no se mueven libremente en el medio intercelular, por lo que su manejo es local en la hendidura sináptica y la envoltura glial. Una vez liberado, el glutamato es removido por los procesos astrocíticos que constituyen la envoltura glial, donde se convierte por medio de la enzima glutamina sintetasa en glutamina. Esta puede ser devuelta a la terminal presináptica, donde a través de una glutaminasa se transforma en glutamato. El aspartato y el glutamato se incluyen dentro de la categoría de las moléculas excitotóxicas, ya que niveles altos de estas sustancias

pueden ocasionar, en neuronas que posean receptores para ellos, una despolarización exagerada que ocasiona muerte celular (Utan, 2016).

2.4.3.2 GABA y glicina

Son neurotransmisores cuya acción es inhibitoria, con predominio de GABA en el encéfalo y glicina en la medula espinal. Se localizan principalmente en interneuronas corticales, y en la mayoría de las neuronas del cerebelo y de los núcleos de la base. GABA se considera el neurotransmisor más abundante del sistema nervioso central junto con el glutamato. Es sintetizado a partir de glutamato por medio de la enzima glutamicodecarboxilasa. Se conocen receptores GABA A, GABA B y GABA C. El receptor más conocido es el de tipo A y comprende un complejo que incluye tres porciones, una porción activa donde se enlaza el neurotransmisor, un canal para el ion cloruro y una porción reguladora. Es de notar la importancia farmacológica de la porción reguladora, dado que agentes ansiolíticos como las benzodiazepinas actúan en ella aumentando la frecuencia y el tipo de apertura de los canales de cloro (Möhler, 2009).

La interacción con el receptor tipo A promueve la hiperpolarización de la membrana postsináptica por el ingreso de iones cloruro, mientras que la activación de los receptores tipo B ocasiona hiperpolarización por incrementos en la salida de potasio, pero se debe señalar la existencia de receptores tipo B en la membrana presináptica, cuyo papel es inhibir la liberación de GABA (Tansey, 2015).

2.4.3.2.1 Importancia fisiológica de GABA

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio en el SNC, y es de vital importancia en la regulación de la capacidad de respuesta y la excitabilidad en las redes corticales humanas (McCormick, 1989). El control GABAérgico está involucrado en la regulación de la cognición, la memoria y el aprendizaje (Möhler, 2009), función motora, ritmos circadianos, desarrollo neuronal, neurogénesis adulta y maduración sexual.

Se sabe que la disfunción en la señalización, así como niveles bajos de GABA son factores centrales en la patogénesis de varios trastornos neurológicos, como la enfermedad del Alzheimer (EA), el trastorno depresivo mayor (TDM), ansiedad (Karan, 2017), autismo, esquizofrenia y el trastorno bipolar (Mahn, 2016).

GABA y sus análogos estructurales se unen y activan receptores GABA. La regulación de la función neural por GABA se produce a través de su interacción con tres clases de receptores principalmente, GABA_A, GABA_B y GABA_C; Estudios actuales han encontrado una menor unión al receptor de GABA_A en los trastornos de ansiedad. La unión al receptor GABA_A genera un efecto ansiolítico y anti depresivo, mayormente relacionado al efecto de los fármacos como las benzodiazepinas. (Karan, 2017)

2.4.4 Péptidos

Se han identificado un gran número de ellos, más de cincuenta. Algunos los denominan neuropéptidos y tienden a presentarse simultáneamente en sinapsis monoaminérgicas y aminoacídicas. Los neuropéptidos participan en múltiples circuitos en el sistema nervioso central, relacionados con la actividad visceral y límbica. Dentro de estos podemos mencionar: sustancia P, neurotensina, vasopresina, oxitocina, colecistoquinina (CCK), neuropéptido Y, encefalinas, betaendorfina, péptido vasointestinal, somatostatina, ACTH, dinorfina, etc (Escobar, 2006).

2.5 Importancia farmacológica de la sinapsis química

La sinapsis química puede ser blanco de diversas manipulaciones farmacológicas, lo cual se traduce en cambios notables de su función, que se reflejan de manera deseable o indeseable en el comportamiento del individuo.

La barrera hematoencefálica, está presente en todo el sistema nervioso y solo algunos órganos circunventriculares carecen de ella. Las uniones estrechas de las células endoteliales impiden la libre difusión del contenido del plasma hacia el tejido. Solo las moléculas pequeñas y lipofílicas atraviesan la barrera con relativa facilidad. Fármacos como los anestésicos generales, que son extremadamente liposolubles, cruzan la barrera sin impedimento alguno aparente y a eso se atribuye la rapidez de su acción (Escobar, 2006).

Muchos de los fármacos que afectan al sistema nervioso interfieren en uno o más mecanismos arriba mencionado (síntesis, liberación, receptores o inactivación). Por ejemplo, la cocaína inhibe la recaptura de la dopamina; la clorpromazina, un antipsicótico, bloquea algunos de los receptores de la dopamina y la ω -conotoxina impide la entrada de Calcio a través de algunos de sus canales. La interferencia en cualquiera de esos pasos puede resultar en neurotoxicidad.

La transmisión sináptica se puede favorecer farmacológicamente de varias maneras: promoviendo la síntesis del neurotransmisor, aumentando su liberación; suministrando agonistas para el receptor; e impidiendo su inactivación (ya sea la recaptura o la degradación). Igualmente existen estrategias farmacológicas para antagonizar los procesos antes mencionados (Whittaker, 1963).

El mal de Parkinson es tal vez, uno de los mejores ejemplos, de la manipulación farmacológica en la sinapsis. En esta condición la mayoría de las neuronas dopaminérgicas que conectan la sustancia negra (*pars compacta*) con el estriado se degeneran. Al perderse dichas neuronas, se disminuye la capacidad de sintetizar DOPA, que es el precursor de la dopamina (DA). La DA no cruza la barrera hematoencefálica, produce muchos efectos secundarios y es degradada rápidamente. La L-DOPA, aunque tiene efectos secundarios es transportada a través de la barrera hematoencefálica por el transportador de aminoácidos neutrales (compitiendo con tirosina, fenilalanina y triptófano). Se puede acompañar la L-DOPA con carbiDOPA que inhibe la degradación de L-DOPA en la periferia, haciendo que haya más L-DOPA disponible para ingresar al cerebro. (Escobar, 2006).

2.5.1 Sinaptosomas como modelo de estudio.

Un sinaptosoma es una terminal sináptica aislada a partir de una neurona (**Figura 3**), los sinaptosomas se obtienen mediante homogeneización de tejido nervioso en condiciones isotónicas y su posterior fraccionamiento mediante centrifugación de gradiente. Estas estructuras son osmóticamente sensibles, contienen numerosas vesículas sinápticas claras y pequeñas, cuentan con las características morfológicas y la mayoría de las propiedades químicas de las terminales nerviosas originales (Whittaker, 1963).

Los sinaptosomas son comúnmente utilizados para estudiar la transmisión sináptica en *estudios in vitro*, gracias a que cuenta con la maquinaria molecular necesaria para la captación, el almacenamiento y la liberación de neurotransmisores. Mantienen un potencial de membrana fisiológico, contienen receptores presinápticos, translocan iones y metabolitos; y cuando se despolarizan liberan múltiples neurotransmisores (ácido glutámico, GABA, serotonina, etc.) (Whittaker, 1963).

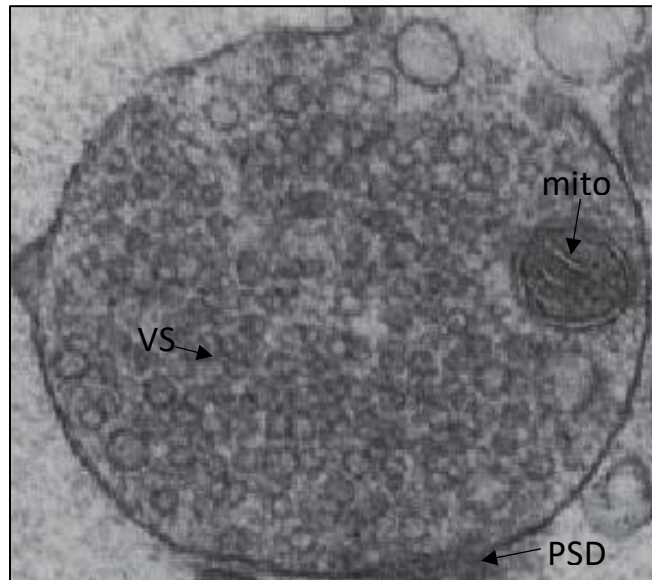


Figura 3. Imagen de un sinaptosoma a 8000X (tomado de Palay, 1978).

En esta imagen se observa un sinaptosoma, formado por vesículas sinápticas (SV) que contienen neurotransmisores, mitocondrias (mito) y una capa de membrana o densidad postsináptica (PSD).

2.6 Uso de herbolaria como tratamiento para trastornos neurológicos

Desde la antigüedad el uso terapéutico de plantas medicinales fue llevado a cabo en diversas civilizaciones, siendo la mexicana una de las que más la utilizaban y utilizan actualmente. Las plantas medicinales por lo general tienen diversos efectos terapéuticos por su gran contenido de moléculas bioactivas. Dentro de las especies de plantas más utilizadas para problemas neuronales y como antiinflamatorios son: la *Aerva sanguinolenta* (Escancel), la *Ibervillea sonora* (Wereke), *Tilia mexicana* (Tila), *Chiranthodendron pentadactylon* (árbol de las manitas), *Ipomea stans* (Tumbavaqueros), *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) y el *Agastache mexicana* (Toronjil), entre otras (Rzedowski, 2010).

2.7 Flavonoides: biosíntesis, clasificación y efectos farmacológicos

Los flavonoides son compuestos presentes en algunas frutas, vegetales, y bebidas derivadas de plantas, por ejemplo: el vino, té, cacao, cerveza y jugo de frutas. El creciente interés en los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica, y se han descrito efectos protectores en diversas condiciones patológicas como la isquemia cardiovascular, la diabetes, la aterosclerosis y el cáncer. Recientemente se propone que los flavonoides por sus efectos benéficos podrían ser un tratamiento alternativo en las enfermedades neurodegenerativas debido a que éstos son capaces de modular la función neuronal. Además, el uso de flavonoides ha mostrado mejorar los procesos cognitivos, posiblemente mediante la protección de neuronas vulnerables a la muerte, así como a la mejora de la función neuronal existente (David, 2008) Dada la relevancia que los flavonoides han adquirido, estos compuestos han sido incluidos en el tratamiento contra la degeneración neuronal presente en patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP). (Commenges, 2000).

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA. La reacción bioquímica que da origen a los flavonoides está controlada por dos enzimas: la chalcona sintasa y la chalcona flavonona isomerasa. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten una estructura común, el difenilpirano (C6- C3-C6), que son compuestos con dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico C de pirano (Manach, 2004) **(Figura 4)**.

Los flavonoides se pueden dividir en varios subgrupos según el carbono del anillo C al que está unido el anillo B y el grado de instauración de oxidación del anillo C **(Figura 4)**. Los flavonoides en los que el anillo B está unido en la posición 3 del anillo C se llaman isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 4 se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles, flavanoles o catequinas, antocianinas y chalconas **(Figura 4)** (Diwan, 2016).

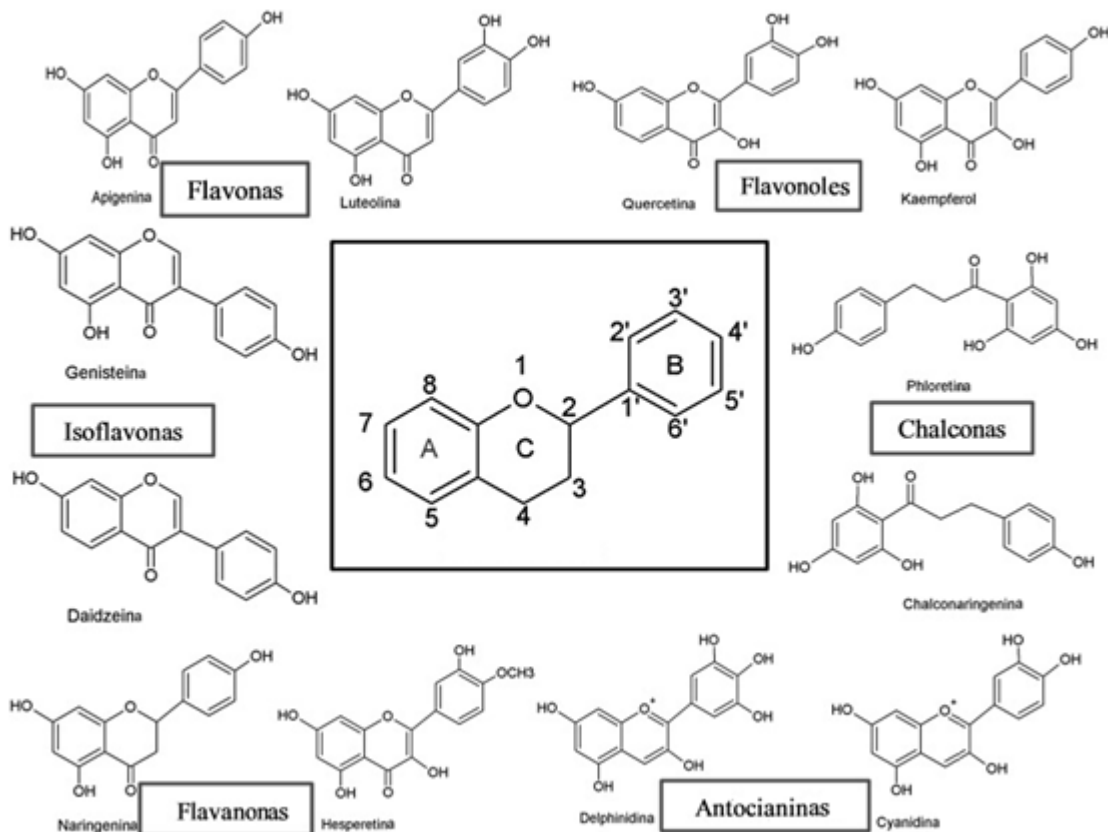


Figura 4. Estructura básica del esqueleto de los flavonoides y sus clases (Diwan, 2016).

Las flavonas son uno de los subgrupos importantes de flavonoides. Las flavonas están ampliamente presentes en las hojas, flores y frutos como glucósidos. El apio, el perejil, los pimientos rojos, la manzanilla, la menta y el ginkgo biloba se encuentran entre las principales fuentes de flavonas. La luteolina, la apigenina y la tangeritina pertenecen a esta subclase de flavonoides. Tienen un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 y una cetona en la posición 4 del anillo C (Madeswaran, 2012).

Los flavonoles son flavonoides con un grupo cetona. Son bloques de construcción de proantocianinas. Los flavonoles se encuentran abundantemente en una variedad de frutas y verduras. Los flavonoles más estudiados son kaempferol, quercetina, miricetina y fisetina. En comparación con las flavonas, los flavonoles tienen un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, que también puede estar glicosilado (Diwan, 2016).

Las flavanonas son otra clase importante que generalmente está presente en todas las frutas cítricas como las naranjas, los limones y las uvas. Hesperitina, naringenina y eriodictyol son ejemplos de esta clase de flavonoides. Las flavanonas, también llamadas dihidroflavonas, tienen el anillo C

saturado; por lo tanto, a diferencia de las flavonas, el doble enlace entre las posiciones 2 y 3 está saturado y esta es la única diferencia estructural entre los dos subgrupos de flavonoides (Ross, 2002).

Los isoflavonoides son un subgrupo grande y muy distintivo de flavonoides. Los isoflavonoides disfrutan solo de una distribución limitada en el reino vegetal y se encuentran predominantemente en la soja y otras plantas leguminosas. Las isoflavonas como la genisteína y la daidzeína se consideran comúnmente fitoestrógenos debido a su actividad estrogénica en ciertos modelos animales (Diwan, 2016).

Los neoflavonoides son una clase de compuestos polifenólicos. Mientras que los flavonoides tienen un esqueleto de 2-fenilcromeno-4-ona, los neoflavonoides tienen un esqueleto de 4-fenilcromeno sin sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2 (Sheng, 2009).

Los flavanoles, también llamados dihidroflavonoles o catequinas, son los derivados 3-hidroxi de las flavanonas. Son un subgrupo altamente diversificado y multisustituido. Los flavanoles también se denominan flavan-3-ols ya que el grupo hidroxilo siempre está unido a la posición 3 del anillo C (Mello, 2011).

Las antocianinas son pigmentos responsables de los colores en plantas, flores y frutas. La cianidina, la delphinidina, la malvidina, la pelargonidina y la peonidina son las antocianinas más estudiadas (Liu, 2013).

Las chalconas son una subclase de flavonoides. Se caracterizan por la ausencia de 'anillo C' de la estructura básica del esqueleto flavonoide. Por lo tanto, también pueden denominarse flavonoides de cadena abierta. Los principales ejemplos de chalconas incluyen floridzina, arbutina, floretina y calconaringenina. Las chalconas se presentan en cantidades significativas en tomates, peras, fresas, gayuba y ciertos productos de trigo (Diwan, 2016).

La capacidad antioxidante de los flavonoides ha sido reconocida en diversos estudios, ya que estos compuestos pueden unirse a las enzimas transportadoras de hormonas y al DNA. Además, pueden quelar iones metálicos como el Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar los radicales libres (Jovanovic S; 2008). Debido a su mecanismo de acción de estos fitoquímicos se han podido usar en patológicas como la diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, así también se les ha dado un uso como antialérgicos, antitrombóticos

e incluso como antiinflamatorios. Se ha demostrado que protegen de la fotooxidación a la Vitamina E en la membrana celular, inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por lo que evitan la formación del ateroma y reducen la citotoxicidad de las LDL (Diwan, 2016).

Diversos estudios *in-vitro* e *in-vivo* dan muestra del potencial de los flavonoides para proteger a las neuronas contra el daño provocado por diversas neurotoxinas. Su potencial neuroprotector se ha mostrado sobre dos mecanismos importantes: el estrés oxidativo y la neuroinflamación (Youdi K; 2001) a través de modelos de muerte neuronal, por ejemplo, el modelo con el péptido amiloide-beta ($A\beta$), el cual juega un papel importante en el desarrollo de la EA. También existen evidencias de que los flavonoides son capaces de mantener la integridad y funcionalidad de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) y del núcleo estriado de roedores tratados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina empleada para generar un modelo de EP. Por lo anterior, los flavonoides pueden ser empleados como agentes neuroprotectores en patologías como la EA y la EP, entre otras enfermedades degenerativas (Luo Smith; 2002). Es importante destacar que los mecanismos de neuroprotección de los flavonoides se deben en particular a su capacidad de interactuar con la señalización neuronal y su potencial para inhibir los procesos inflamatorios en el cerebro (Chen J, 2005).

2.8 *Agastache mexicana*, una especie rica en flavonoides

Agastache mexicana es una especie de planta medicinal perteneciente a la familia Lamiaceae, comúnmente conocida como toronjil, es originario de México; está presente en climas cálido, semicálido y templado entre el nivel del mar y los 780m s. n. m. y desde los 1600 a los 3900m s. n. m. Es una hierba asociada a bosque tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio y a bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y misto de encino-pino (Santillán, 2008).

En la medicina tradicional, en los estados de México, Hidalgo, Michoacán, Morelos y Puebla, esta planta se usa frecuentemente para tratar el espanto. En algunas comunidades también se emplea en la curación del mal de ojo, provocado principalmente por la mirada pesada de las personas que afecta a los niños. Las infusiones administradas por vía oral se recomiendan en diversos padecimientos principalmente en problemas gástricos como dolor de estómago, cólico de estómago, corajes, dolor intestinal, empacho y para la digestión. También se usa en alteraciones cardiovasculares como dolor de corazón y cuando se tapan las venas. Se refiere útil cuando hay tos, insomnio y como adyuvante para el tratamiento de la diabetes (López, 2008).

Esta especie vegetal contiene (principalmente en sus extractos polares) flavonoides como tilianina (**Figura 5**), el cual presenta efecto vasodilatador dependiente de endotelio mediante la liberación de óxido nítrico y un efecto independiente de endotelio mediante la apertura de canales de potasio (Hernández et al., 2009). Se han aislado también ácido ursólico, ácido oleanólico y acetina de *A. mexicana*, los cuales presentan actividades antiinflamatorias, antidiabéticas, antihipertensivas, antiespasmódicas y antilipídémicas (Gonzales et al., 2012; Ramírez et al., 2014), dichos compuestos actúan bloqueando los canales de calcio dependientes de voltaje e inducen la apertura de canales de potasio. El ácido ursólico, oleanólico y acetina inducen la secreción de óxido nítrico mediante la presencia del endotelio (Flores et al., 2016).

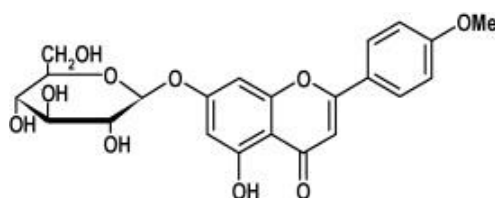


Figura 5. Estructura química de tilianina (Hernández et al., 2009).

2.8.1 Antecedentes directos de *A. mexicana* y tilianina

En el 2015 Gonzales-Trujano et al. llevaron a cabo la determinación del efecto depresor del extracto metanólico de *Agastache mexicana*, y uno de sus componentes mayoritarios, la tilianina. En este trabajo de investigación se obtuvo como resultado que el extracto metanólico (10-300mg/kg) y la tilianina (30-300mg/kg) mostraban actividades similares a las del ansiolítico de referencia (0.1 mg/kg diazepam) aunque menos potentes. También se llevó a cabo un ensayo de laberinto en cruz elevado, con el cual se obtuvo como resultado una disminución del efecto ansiolítico producido por la tilianina en presencia de flumazenil (antagonista GABA_A/BZD). Por otro lado, de manera teórica; la tilianina se analizó como un posible ligando del receptor GABA_A/BZD utilizando un modelo farmacológico; en el cual se realizó un mapeo farmacológico del diazepam (agonista GABA_A/BZD) y la tilianina (**Figura 6**). Obteniendo como resultado que la tilianina presentaba 6 de 7 características farmacológicas presentes en el diazepam. De manera que, tilianina se propone como un posible ligando del receptor GABA_A/BZD (Gonzales-Trujano et al., 2015).

Con base en lo anterior y los diversos efectos farmacológicos de *A. mexicana* y tilianina conocidos hasta la fecha, es de gran interés evaluar el efecto de liberación de neurotransmisores a

nivel de sistema nervioso central, para determinar un posible efecto ansiolítico y proponer a tilianina como un posible fármaco para combatir la ansiedad.

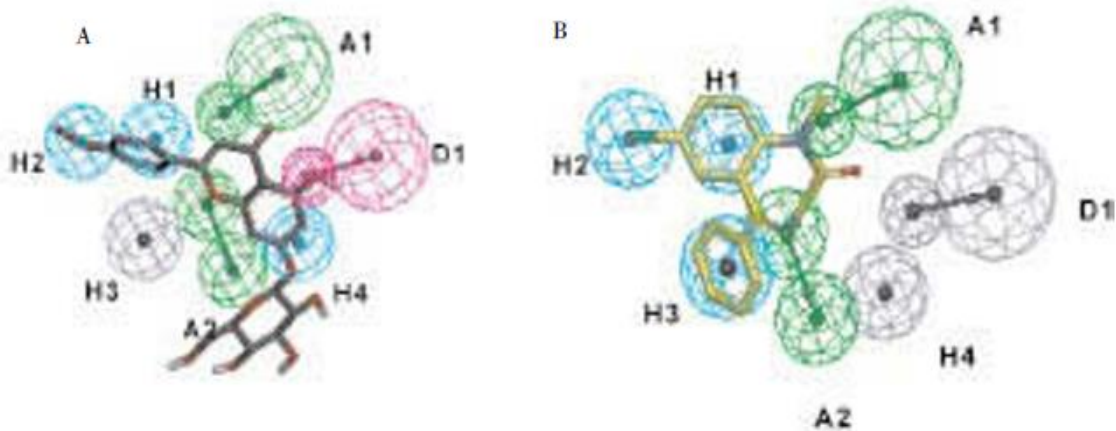


Figura 6. Modelo farmacóforo de tilianina (A) y diazepam (B) (Gonzales- Trujano et al., 2015).

H1-H4 (color azul) representa la región hidrofóbica, A1 y A2 (color verde) representan un aceptor de enlaces de hidrógeno, y D1 (color magenta) representa un donante de enlaces de hidrógeno.

JUSTIFICACIÓN

3. Justificación

Los trastornos neurológicos como la ansiedad y la depresión afectan a gran parte de la población de jóvenes y adultos a nivel mundial, dichos trastornos neurológicos requieren de tratamientos costosos que no se incluyen en el cuadro básico de las instituciones de seguridad social en diferentes países. Las crisis nerviosas y el distanciamiento social que pueden provocar la ansiedad y la depresión afectan la economía del paciente y su familia, además de interferir con su estilo de vida, así como en sus relaciones personales; consecuente a esto los trastornos neurológicos son causa importante de suicidio; por lo que actualmente se buscan nuevos compuestos químicos que puedan ser utilizados para el tratamiento de la ansiedad y la depresión, con costos más bajos y menores efectos adversos. Una de las mejores opciones para la obtención de nuevos compuestos es a partir de plantas medicinales, ya que desde la antigüedad distintas civilizaciones las han utilizado para tratar diversas enfermedades. En México existe una gran variedad de plantas medicinales, como *Agastache mexicana*, la cual ha mostrado diversos efectos terapéuticos, entre los que se encuentra el efecto ansiolítico, actualmente se atribuye este efecto a tilianina, un flavonoide presente en gran medida en el extracto metanólico de *A. mexicana*, por ello es de interés llevar a cabo la evaluación del efecto de liberación y cuantificación de neurotransmisores como GABA y serotonina de manera *in vitro*; para confirmar el efecto ansiolítico y elucidar un posible mecanismo de acción relacionado a dicho efecto a nivel de sistema nervioso central.

HIPÓTESIS

4. Hipótesis

El extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* aumentarán la liberación de neurotransmisores (GABA y serotonina) en sinaptosomas obtenidos a partir de cerebro de ratón.

OBJETIVOS

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto producido por el extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la liberación *in vitro* de neurotransmisores (GABA y serotonina) en sinaptosomas.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Evaluar el efecto producido por el extracto metanólico de *Agastache mexicana* sobre la liberación *in vitro* de neurotransmisores (GABA y serotonina) en sinaptosomas.

5.2.2 Evaluar el efecto producido por tilianina obtenida de *Agastache mexicana* sobre la liberación *in vitro* de neurotransmisores (GABA y serotonina) en sinaptosomas.

METODOLOGÍA

6. Metodología

6.1. Obtención del extracto metanólico de *Agastache mexicana* (EMAm)

En noviembre de 2016, las plantas y los frutos maduros de *A. mexicana* se recolectaron en el bosque de pino-encino de Felipe Neri, Tlalnepantla, Morelos, México. Un ejemplar de cupón (número 35766) se depositó en el HUMO-Herbario del Centro de Investigación de Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México. El material vegetal se secó, pulverizó y a partir de este, se hicieron extracciones mediante maceración en metanol (durante 72 horas a temperatura ambiente). Posteriormente el extracto se filtró y se concentró al vacío a 40°C.

6.2. Modelo experimental

Como modelo experimental, se utilizaron sinaptosomas obtenidos de cerebro de ratones hembra (*Mus musculus*) cepa CD-1, de 2 meses de edad aproximadamente.

6.3 Disección de cerebro y obtención de los sinaptosomas

Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio con acceso libre a alimentos y agua. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Federales Mexicanas para Experimentación y Cuidado de Animales (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, México) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (UNAM) con base en el Instituto Nacional de EE. UU. Publicación de salud (n. 85-23, revisada en 1985). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la disección del cerebro sobre una placa con hielo triturado. Una vez extraído el cerebro, se obtuvieron los sinaptosomas mediante el procedimiento reportado por Hajos (1979).

El tejido neuronal obtenido se homogeneizó en 10 volúmenes (m/v) de sacarosa 0.32M, posteriormente se centrifugó a 1500g durante 10 minutos, el pellet se descartó y se trabajó con el sobrenadante obtenido, el cual se centrifugó a 9000g (gravidades) durante 20 minutos; el pellet obtenido se re suspendió en 2.5 volúmenes (peso original) de sacarosa 0.32M y se agregó dicha suspensión sobre 4 volúmenes (peso original) de sacarosa 0.8M para formar un gradiente; se centrifugó a 9000g durante 25 minutos, la suspensión obtenida se diluyó 2.5 veces y se centrifugó una última vez a 9000g durante 20 minutos. Los sinaptosomas se encontraron en el pellet obtenido al final.

Una vez obtenidos los sinaptosomas se resuspendieron en **1.5ml** de buffer Krebs-Ringer modificado (medio basal) (**Tabla 1**) a un pH de 7.4 y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Tabla 1. Composición de los medios basal y de liberación. (Abarca, 2003)

Reactivos	Medio Basal (Control -)	Medio de liberación (Control +)
NaCl	118.0mM	75.70mM
KH ₂ PO ₄	1.18mM	1.18mM
KCl	4.7mM	47.0mM
CaCl ₂	2.5mM	2.5mM
MgSO ₄	1.18mM	1.18mM
C ₄ H ₁₁ NO ₃	20.0mM	20.0mM
Glucosa	5.6mM	5.6mM

6.4 Experimentos de liberación y cuantificación de neurotransmisores

Los tratamientos que se evaluaron fueron diferentes concentraciones de EMAM (10µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml) y tilianina (0.022 µM, 0.055 µM y 0.11 µM) sobre el efecto de liberación de ácido glutámico, GABA y serotonina, a partir de **200µl** de la solución de sinaptosomas obtenidos de **3** cerebros de ratón hembra cepa CD-1. Teniendo como control positivo al medio de liberación y teniendo como control negativo al medio basal (**Tabla 1**), con un total de 5 repeticiones.

La obtención de neurotransmisores se llevó a cabo con ayuda de un sistema de perfusión automático marca Brandel, el cual consiste en una cámara de perfusión conectada por una manguera a través de una bomba peristáltica al medio de perfusión. Se colocaron los viales en el carro de colecta y se llenaron las mangueras con medio basal para poder iniciar con el lavado de los tejidos. **200µl** de la solución de sinaptosomas obtenidos a partir del tejido cerebral de **3** ratones se depositaron en membranas milipore Whatman GF/B de 0.45 µM, las cuales se colocaron a su vez en una cámara de perfusión con medio basal (**Tabla 1**).

Una vez montado el sistema de perfusión, se llevó a cabo un lavado previo del tejido durante un periodo de 10 minutos en condiciones basales con buffer-krebs-Ringer modificado (**Tabla 1**).

Posterior al lavado, se colocaron las diferentes condiciones experimentales (**Tabla 2**) y se colectaron alícuotas de 1 ml cada minuto.

Tabla 2. Condiciones experimentales.

Carril	Condición ensayo 1 [EMAm]	Condición ensayo 2 [EMAm]	Condición ensayo 3 [tilianina]
1	C-	C-	C-
2	C+	C+	C+
3	10 µg/ml	100 µg/ml	0.022µM
4	50 µg/ml	100 µg/ml	0.055µM
5	100 µg/ml	100 µg/ml	0.11µM
6	100 µg/ml	100 µg/ml	0.022µM

El sistema de perfusión se utilizó a condiciones de temperatura a 37°C durante todo el experimento, y se trabajó a una velocidad de flujo de 1ml/min para cada alícuota.

Posterior a los ensayos de perfusión, las alícuotas colectadas se procesaron para la cuantificación de los diferentes neurotransmisores evaluados (**Tabla 3**), mediante la comparación con unas curvas estándar (**Anexo 1**) en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC HITACHI), que previamente se derivatizó con O-Phthaldialdehido (OPA) en un detector de fluorescencia (LaChrom L-7351). La columna que se utilizó en el HPLC es de marca Cartridge-LiChrospher 100, RP-18 en fase reversa de 5µm en el tamaño de partícula.

Tabla 3. Preparación de muestras para el HPLC. (modificado de Castro, 2011)

La solución de OPA [10mg/ml] se preparó a partir de OPA + Metanol (concentrado) + Mercaptoetanol (concentrado) + Borato de sodio [0.1M], mientras que la solución OPA [5mg/ml] se preparó solo diluyendo en Metanol.

Neurotransmisor	GABA/Glutámico	Serotonina
Cantidad de Muestra	20µL	20µL
Cantidad de OPA [5mg/ml]	20µL	---
Cantidad de OPA [10mg/ml]	---	12.5µL
Cantidad de NaOH [0.1M]	---	50µL
CH ₃ COONa [0.1M] pH 7.3	360µL	---
Cantidad de HCl [3N]	---	25µL
Cantidad de H ₂ O Grado HPLC	---	232µL

Para que se llevara a cabo una buena separación de los neurotransmisores en el HPLC, se estableció un programa de gradiente donde se variaron las concentraciones de los solventes utilizados durante el análisis de cada muestra, mostrado en la **tabla 4**.

Tabla 4. Programa de gradiente para el HPLC.

Tiempo (min)	Acetato Na (%)	MetOH (%)
6	80	20
6.5	50	50
10	50	50
12	100	0
13	100	0
15	80	20

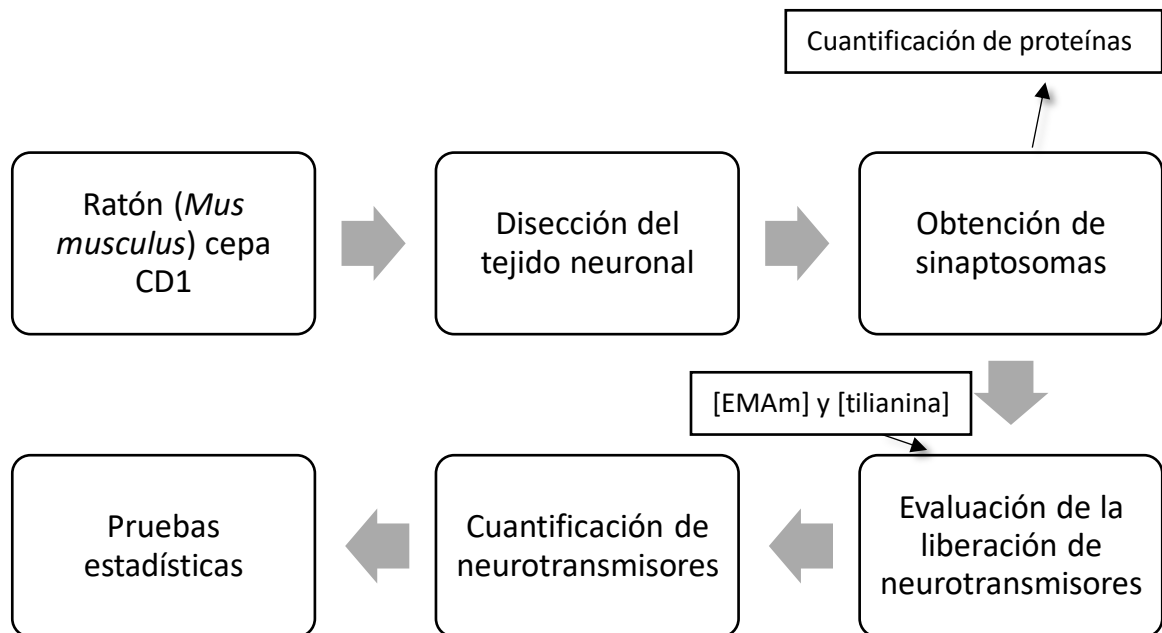
Por último, los sinaptosomas obtenidos de cerebro de ratón utilizados en cada condición experimental fueron homogenizados en 1ml de agua destilada, a una velocidad de 50 r.p.m. durante 2 minutos. De los homogenizados se cuantificó el contenido de proteína por el método de Lowry (Lowry et al. 1951). Los resultados se obtuvieron con ayuda de una curva estándar, partiendo de una serie de diluciones de concentración conocida de BSA (albumina de suero de bovino). Los

resultados del estudio se reportaron como picomoles de neurotransmisor endógeno liberado por miligramo de proteína obtenida (*pmol/mg de proteína*)

6.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza unifactorial, donde el factor fue la concentración de tilianina (10, 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$) y la variable de respuesta fue la liberación de neurotransmisores (serotonina) cuantificada mediante un método de HPLC. En caso de diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey ($P < 0.05$). [Las diferencias entre el control negativo y la concentración de tilianina (0.022 μM y 0.055 μM), se determinaron por medio de una prueba “t de Student”. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R 3.5.1 (2018).]

6.6 Estrategia experimental



RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de sinaptosomas a partir de tejido neuronal de ratón.

En la **figura 7** se muestra una fotomicrografía de tejido neuronal de ratón posterior a su tratamiento para la obtención de sinaptosomas, las flechas de color azul señalan dos sinaptosomas, dentro de ellos se aprecia la acumulación de vesículas sinápticas, lo cual confirma que la metodología utilizada para la obtención de sinaptosomas es válida.

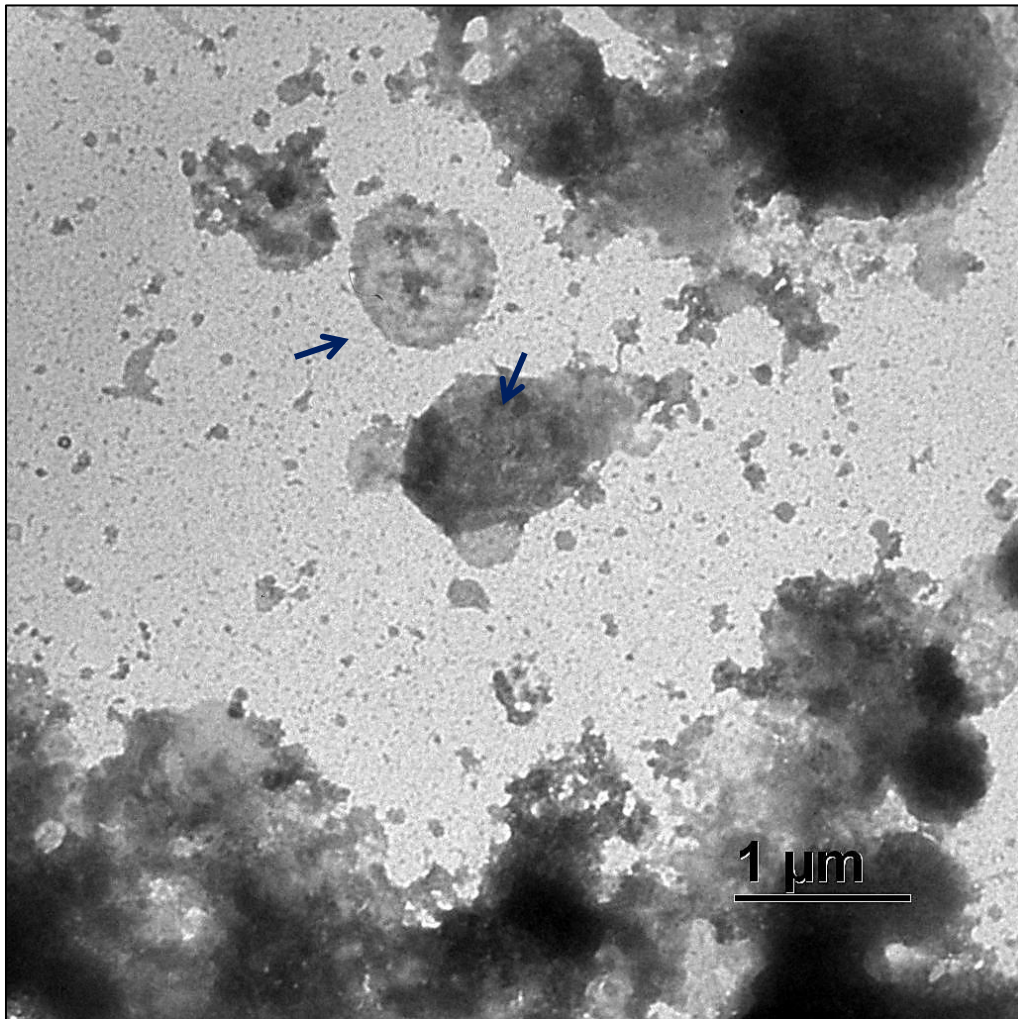


Figura 7. Fotomicrografía de sinaptosomas.

Fotografía obtenida a partir de un microscopio electrónico de transmisión ZEISS LIBRA 120. Teñido durante 1 minuto con acetato de uranilo y observado a un aumento de 4000X.

→ Sinaptosomas

7.2 Cuantificación de la liberación de neurotransmisores producido por diferentes concentraciones de EMAM

Para este punto se obtuvieron curvas estándar (**Anexo 1**), y, a partir de estas, se calculó la ecuación de la recta para cada neurotransmisor de interés (ácido glutámico, GABA y serotonina). Gracias a estas curvas se obtuvo el tiempo de retención de cada neurotransmisor, los cuales se observan en la **figura 8**.

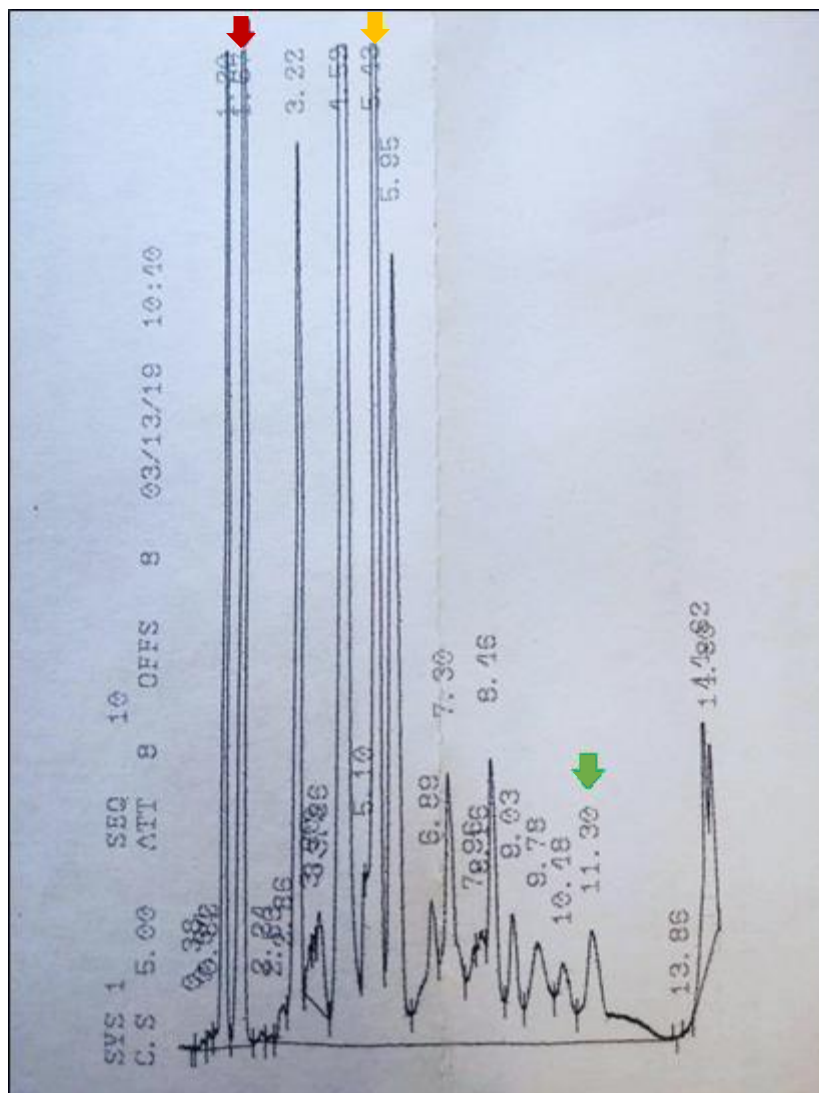
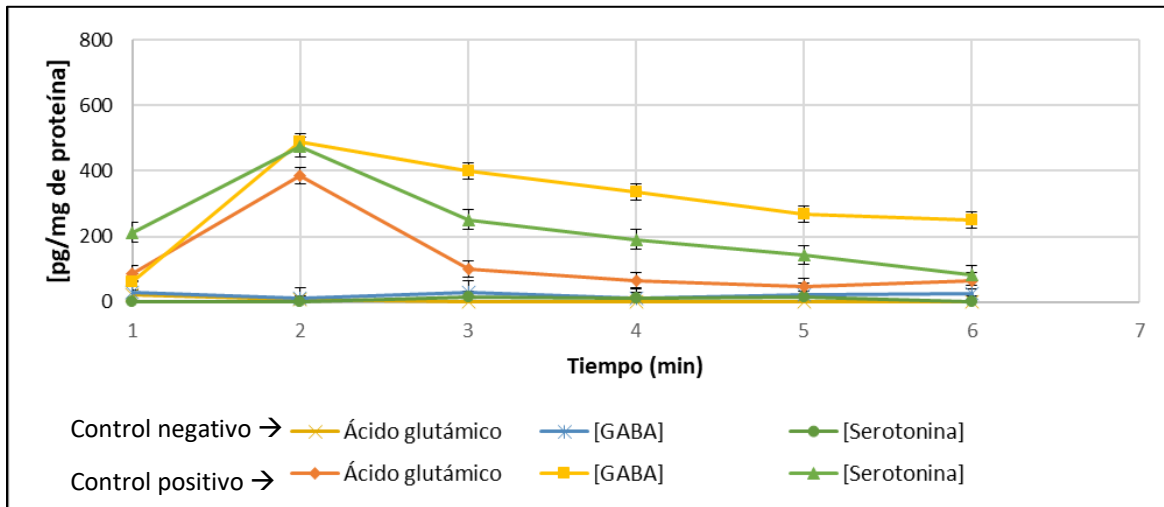


Figura 8. Cromatograma obtenido a partir de HPLC con detector de fluorescencia.

Se observa la detección de neurotransmisores a distintos tiempos: **ácido glutámico** (1.60-1.70min), **GABA** (5.40-5.50min) y **serotonina** (11.25-11.30min).

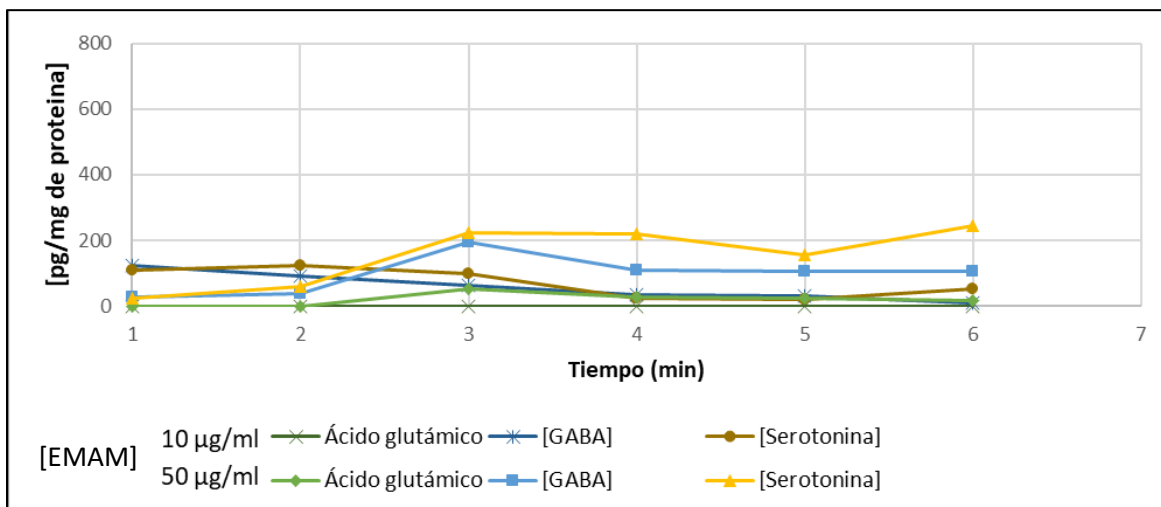
Con base en lo anterior se obtuvieron los siguientes resultados, en la **gráfica 1** se puede apreciar el efecto de liberación de ácido glutámico, GABA y serotonina producido por el control negativo (basal) y el control positivo ([KCl]=47mM). El control negativo mantiene una liberación baja (60pg/mg de proteína aprox.) de los neurotransmisores evaluados (ácido glutámico, GABA y serotonina), mientras que el control positivo muestra un aumento (400-500pg/mg de proteína aprox.) en la liberación de estos neurotransmisores.



Gráfica 1. Liberación de distintos neurotransmisores a condiciones control (ensayo 1).

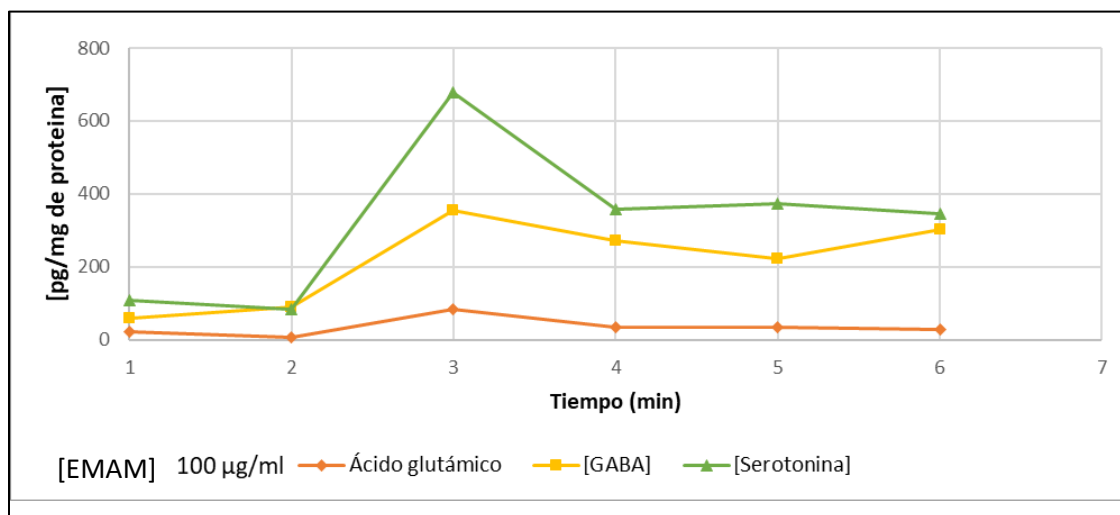
Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) en condiciones basales (control negativo) y a una concentración de KCl de 47mM (control positivo). Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Por otra parte, se obtuvieron las **gráficas 2 y 3**, en las cuales se observa un aumento en la liberación de GABA (180-380pg/mg de proteína) y serotonina (280-680pg/mg de proteína) al aumentar la concentración del EMAM; mientras que el ácido glutámico se mantiene a concentraciones bajas (20-80pg/mg de proteína), aun aumentado la concentración de dicho extracto.



Gráfica 2. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de EMAM (10 y 50 µg/ml).

Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) a una concentración de 10 y 50µg/ml de extracto metanólico de *Agastache mexicana*. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

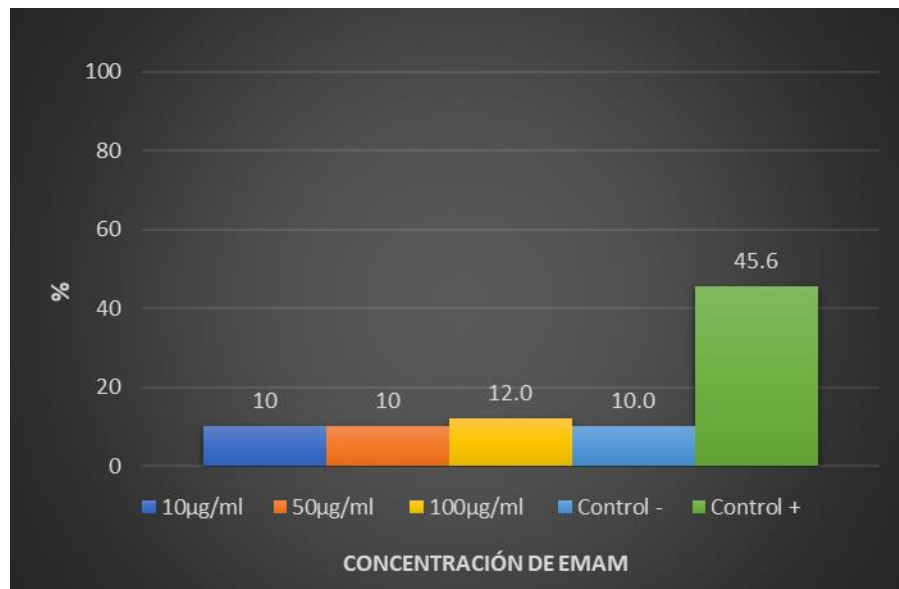


Gráfica 3. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de EMAM (100µg/ml).

Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) a una concentración de 100µg/ml de extracto metanólico de *Agastache mexicana*. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

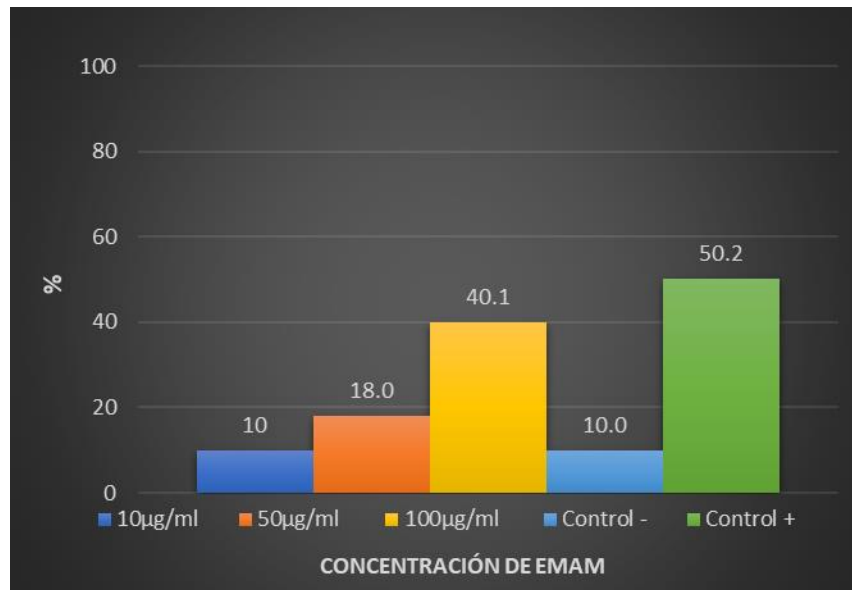
7.3 Porcentaje de liberación de neurotransmisores con respecto al valor basal producido por diferentes concentraciones de EMAM

Se observa que, a una concentración de 100µg/ml de extracto metanólico de *Agastache mexicana* se obtiene en general, la mayor diferencia con respecto a la liberación basal de cada uno de los neurotransmisores evaluados (**Gráfica 4, 5 y 6**).



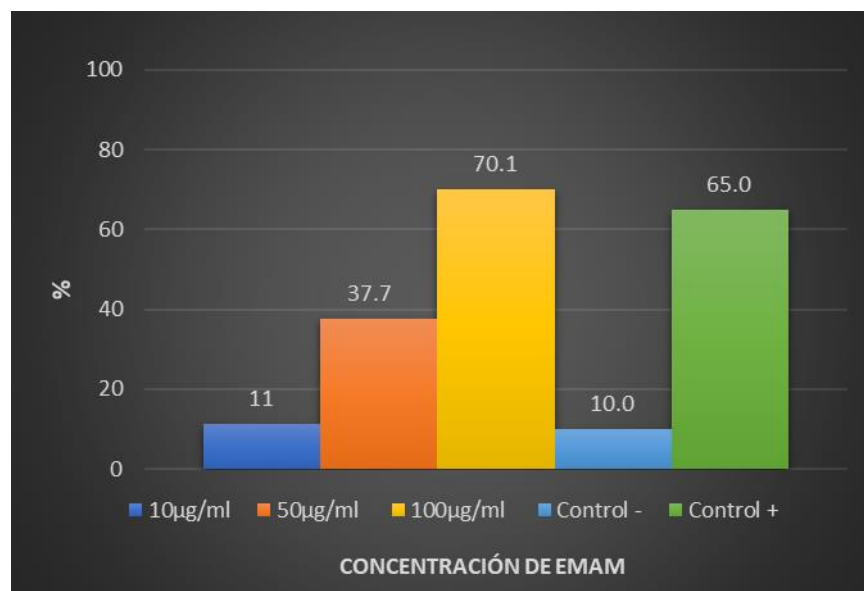
Gráfica 4. Porcentaje de liberación de ácido glutámico con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%). EMAM: Extracto metanólico de *Agastache mexicana*



Gráfica 5. Porcentaje de liberación de GABA con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%). EMAM: Extracto metanólico de *Agastache mexicana*



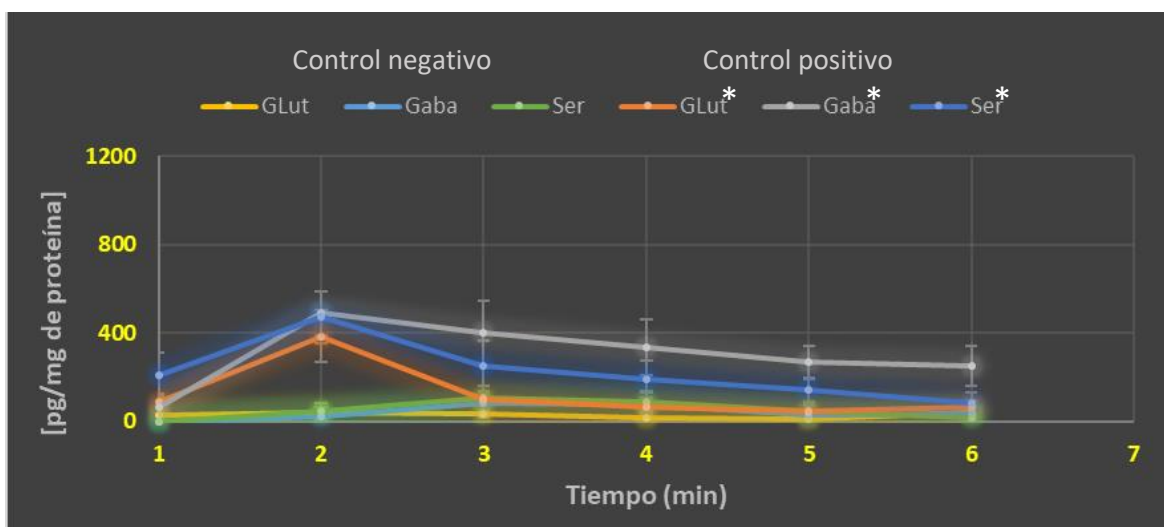
Gráfica 6. Porcentaje de liberación de serotonina con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%). EMAM: Extracto metanólico de *Agastache mexicana*

Con base en los resultados anteriores, se decidió aumentar el número de ensayos para evaluar de manera estadística a la concentración de 100µg/ml de EMAM.

7.4 Cuantificación de la liberación de neurotransmisores producido por una concentración de 100µg/ml de EMAM

En la **gráfica 7** se expresa el efecto de liberación de distintos neurotransmisores obtenido a partir de las condiciones basales (control negativo) y a una concentración de KCl de 47mM (control positivo), se aprecia una diferencia significativa en el efecto de liberación de neurotransmisores entre ambos controles.

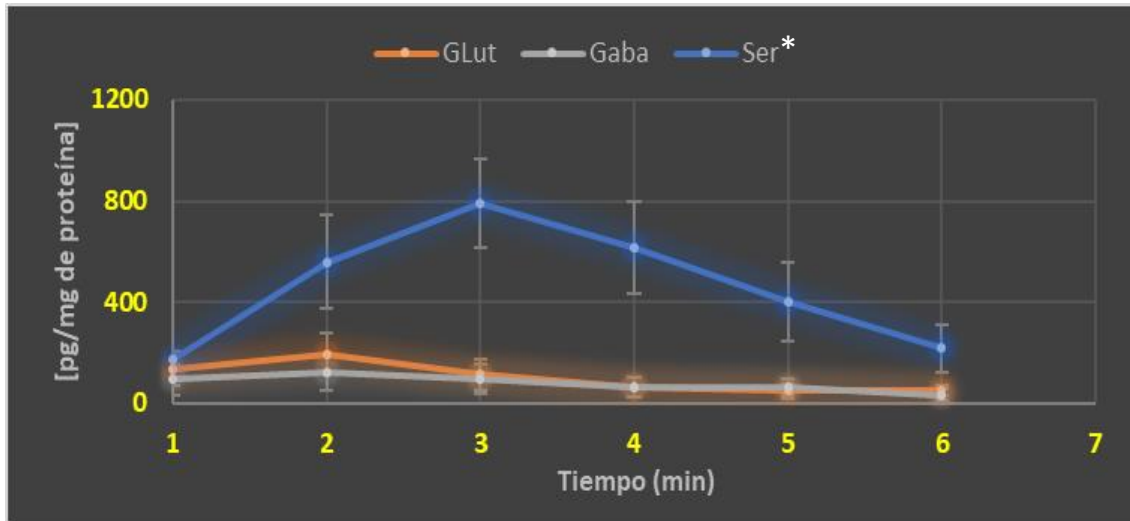


Gráfica 7. Liberación de distintos neurotransmisores a condiciones control (ensayo 2).

Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) en condiciones basales (control negativo) y a una concentración de KCl de 47mM (control positivo). Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Promedio \pm EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa

En la **gráfica 8** se presenta la liberación de neurotransmisores producida por 100µg/ml de EMAM, en la cual se observa una diferencia entre la liberación de ácido glutámico y GABA (180-200pg/mg de proteína aprox.) con respecto a la liberación de serotonina (800pg/mg de proteína aprox.). El efecto mostrado por 100µg/ml de EMAM, fue superior en cuanto a liberación de serotonina con respecto al control negativo (**Gráfica 7**), obteniendo diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia de $p < 0.05$.



Gráfica 8. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de EMAM (100µg/ml).

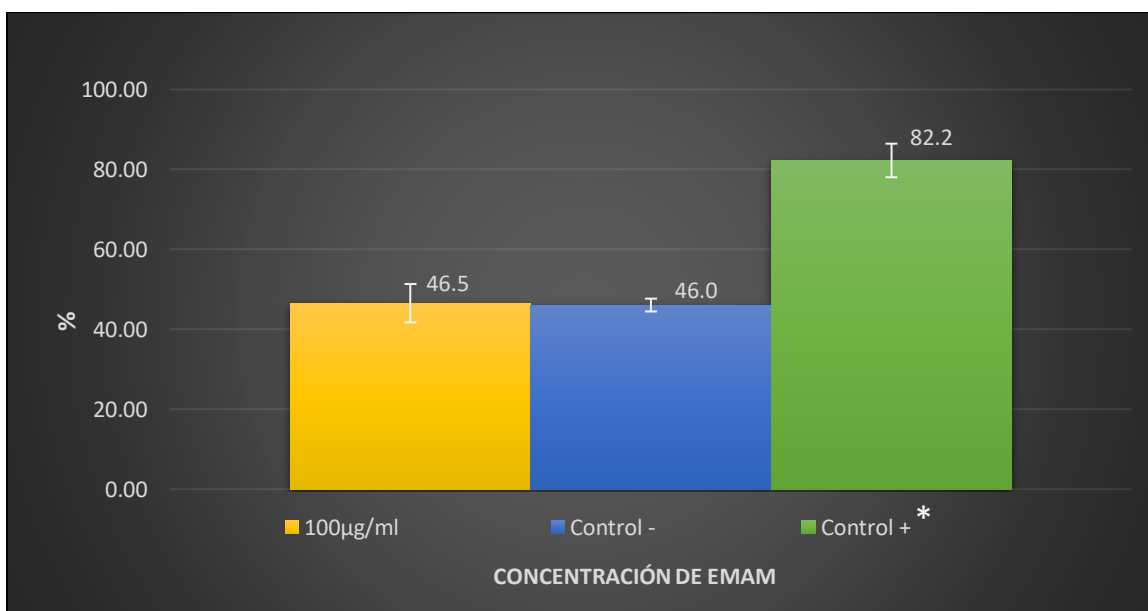
Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) a una concentración de 100µg/ml de extracto metanólico de *Agastache mexicana*. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Promedio \pm EEM n=5 F= 4.10 $p < 0.05$ * muestra diferencia significativa

7.5 Porcentaje de liberación de neurotransmisores con respecto al valor basal producido por una concentración de 100µg/ml de EMAM

En las **gráficas 9, 10 y 11** se muestra el valor porcentual obtenido a partir de la diferencia de liberación máxima de neurotransmisor (ácido glutámico, GABA y serotonina respectivamente) con respecto a la liberación basal del mismo, producido por una concentración de 100µg/ml de EMAM.

En la **gráfica 9** se observa que la concentración de 100µg/ml de EMAM no ejerce un efecto sobre la liberación de ácido glutámico.

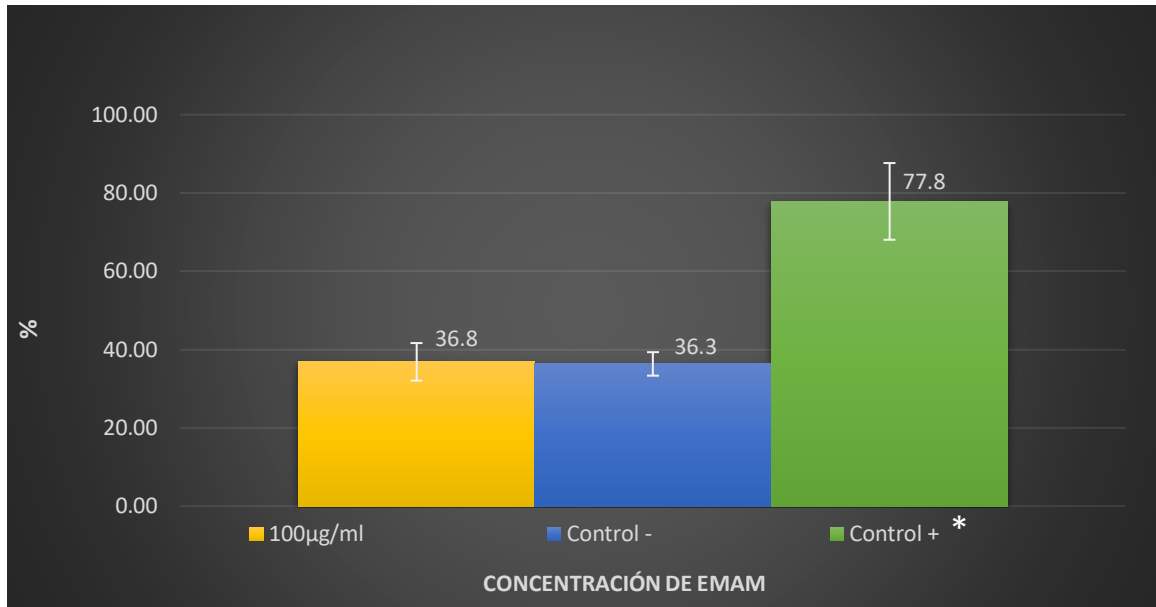


Gráfica 9. Porcentaje de liberación de ácido glutámico con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%).

Promedio \pm EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa

La **gráfica 10** refleja el porcentaje de liberación de GABA con respecto al basal, en la cual, de manera similar a los resultados obtenidos con el ácido glutámico, no se observa una diferencia en la liberación de este neurotransmisor producido por una concentración de 100µg/ml de EMAM.

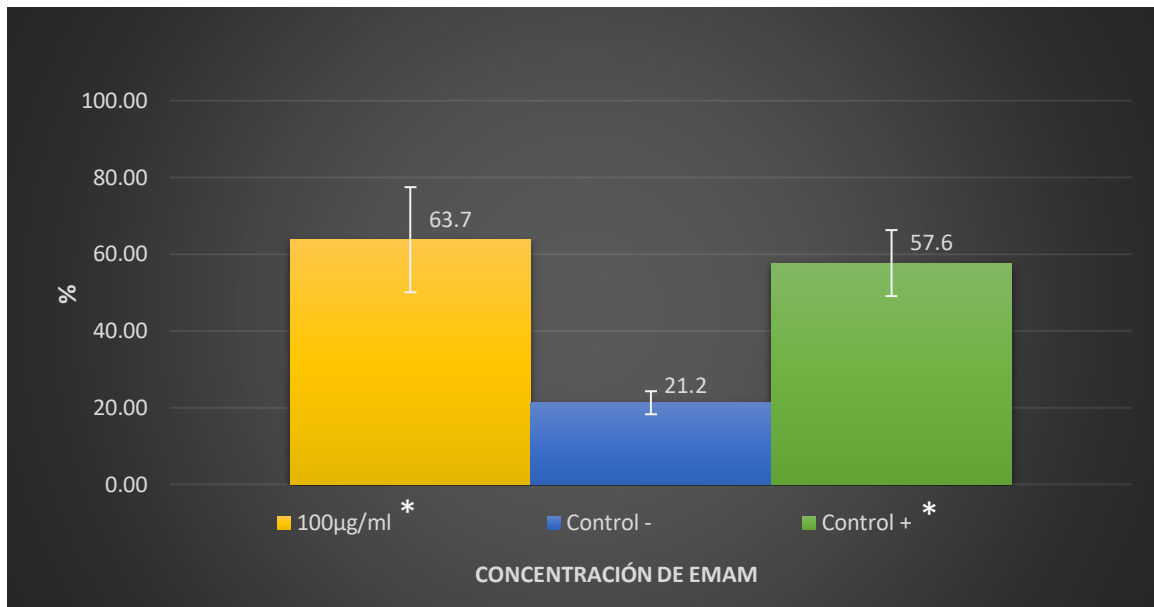


Gráfica 10. Porcentaje de liberación de GABA con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%).

Promedio \pm EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa

Por otro lado, en la **gráfica 11**, se observa una diferencia entre la liberación de serotonina con respecto al basal (42.5% aprox.), el porcentaje de liberación de serotonina obtenido por el EMAM es de 63.7% aproximadamente (3 veces mayor), mientras que, el control negativo se mantiene en 21.2% aprox.



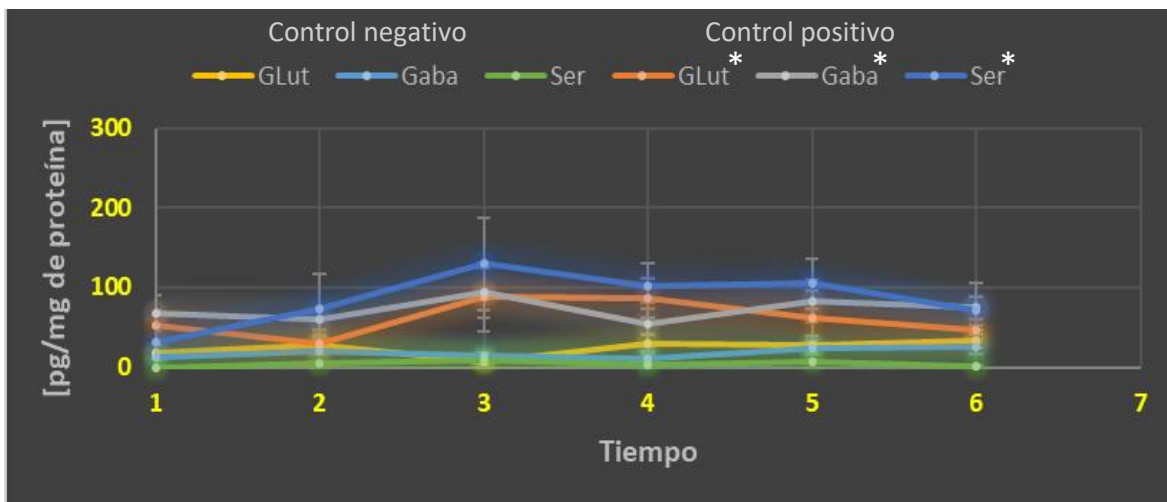
Gráfica 11. Porcentaje de liberación de serotonina con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%).

Promedio \pm EEM n=5 F=4.10 p<0.05 * muestra diferencia significativa

7.6 Cuantificación de la liberación de neurotransmisores producido por diferentes concentraciones de tilianina

Para evaluar el efecto de liberación de neurotransmisores producido por tilianina, se obtuvo la **gráfica 12** en la cual podemos observar que el control negativo (condiciones basales) no tiene una liberación de los neurotransmisores evaluados (ácido glutámico, GABA y serotonina) mayor a 20pg/mg de proteína, mientras que el control positivo muestra una liberación mínima de 60pg/mg de proteína.



Gráfica 12. Liberación de distintos neurotransmisores a condiciones control (ensayo 3).

Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) en condiciones basales (control negativo) y a una concentración de KCl de 47mM (control positivo). Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Promedio \pm EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa

Las **gráficas 13, 14 y 15** muestran el efecto de liberación de neurotransmisores producido por diferentes concentraciones de tilianina (0.022, 0.055 y 0.11 μ M respectivamente).

Una concentración 0.022 μ M de tilianina (**Gráfica 13**) produjo una liberación de serotonina (200pg/mg de proteína aprox.) estadísticamente significativa con respecto al control negativo (**Gráfica 12**); mientras que la liberación de GABA (80pg/mg de proteína) y ácido glutámico (5pg/mg de proteína) producida por esta concentración de tilianina no fue significativa.

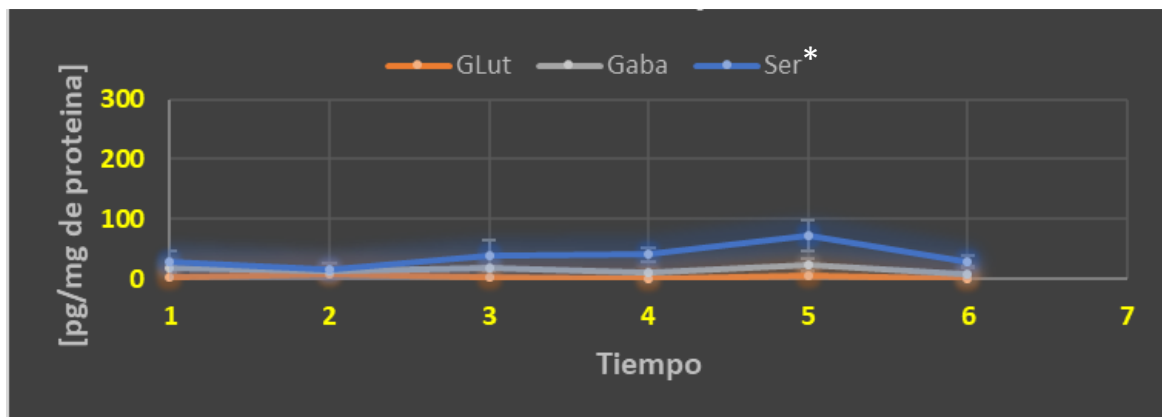


Gráfica 13. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de tilianina (0.022µM).

Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) a una concentración de 0.022µM de tilianina. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Promedio ± EEM n=5 F=4.36 p<0.05 * muestra diferencia significativa

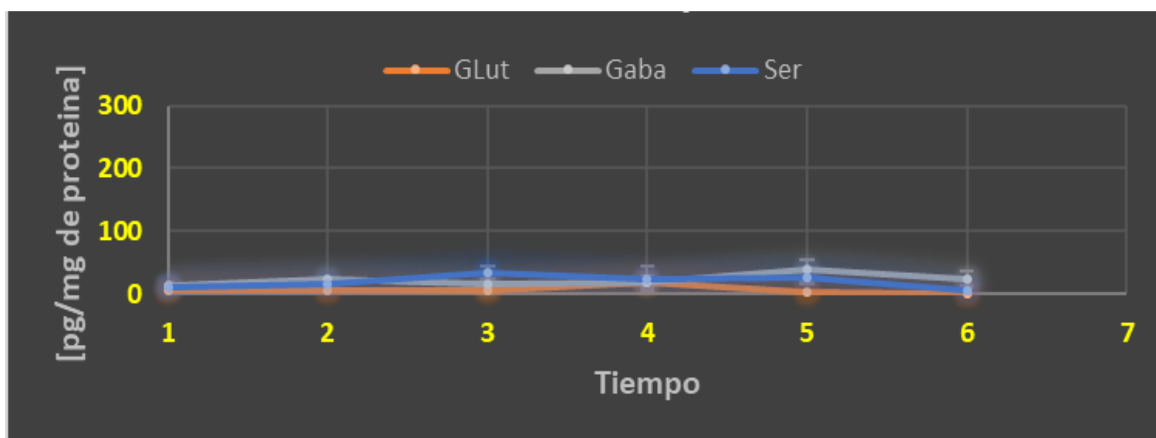
El efecto de liberación de neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) producido por las concentraciones 0.055µM (**Gráfica 14**) y 0.11µM (**Gráfica 15**) de tilianina, no mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo (**Gráfica 12**).



Gráfica 14. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de tilianina (0.055µM).

Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) a una concentración de 0.055µM de tilianina. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Promedio ± EEM n=5 F=4.36 p<0.05 * muestra diferencia significativa



Gráfica 15. Liberación de distintos neurotransmisores en presencia de tilianina (0.11µM).

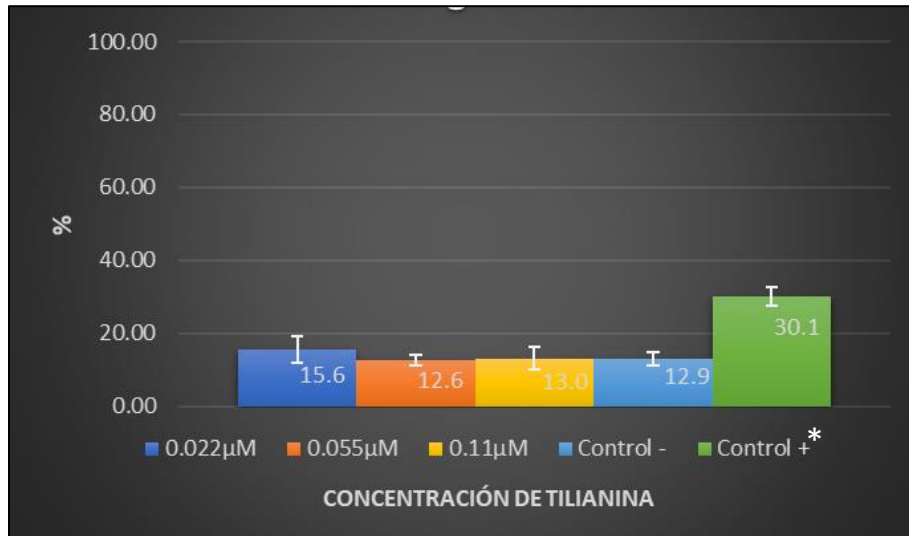
Efecto de liberación de distintos neurotransmisores (ácido glutámico, GABA y serotonina) a una concentración de 0.11µM de tilianina. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína. Los resultados son expresados en pg de neurotransmisor/mg de proteína.

Promedio ± EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa

7.7 Porcentaje de liberación de neurotransmisores con respecto al valor basal producido por diferentes concentraciones de tilianina

En las **gráficas 16, 17 y 18** se expresa el valor porcentual obtenido a partir de la diferencia de liberación máxima de neurotransmisor (ácido glutámico, GABA y serotonina) con respecto a la liberación basal del mismo, producido por diferentes concentraciones de tilianina (0.022, 0.055 y 0.11µM).

En las **gráficas 16 y 17** se observa que las concentraciones evaluadas de tilianina no muestran diferencia porcentual significativa sobre la liberación de ácido glutámico y GABA respecto al control negativo. Mientras que, en la **gráfica 18** se aprecia que la concentración 0.022µM y 0.055µM de tilianina, si presentan diferencia estadísticamente significativa respecto al porcentaje de liberación basal (control negativo).



Gráfica 16. Porcentaje de liberación de ácido glutámico con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%).

Promedio \pm EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa



Gráfica 17. Porcentaje de liberación de GABA con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%).

Promedio \pm EEM n=5 p<0.05 * muestra diferencia significativa



Gráfica 18. Porcentaje de liberación de serotonina con respecto a la concentración basal.

Los resultados son expresados en porcentaje (%).

Promedio \pm EEM n=5 F=4.36 p<0.05 * muestra diferencia significativa

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

La neurotransmisión es un proceso complejo en el que se ven involucrados diferentes factores (fisiológicos) sobre la liberación de neurotransmisores. La alteración de este proceso puede desencadenar el desarrollo de trastornos neurológicos como la ansiedad y depresión, entre otros (Castro, 2011). Actualmente, la literatura relaciona el efecto conductual con los niveles de GABA y serotonina (Zhuang, 2018), lo cual nos lleva a pensar que extractos obtenidos de plantas medicinales (*Agastache mexicana*), así como fármacos obtenidos de estos (tilianina), que han demostrado tener efectos conductuales de manera *in vivo* (González, 2015), puedan verse relacionados con la liberación de GABA y serotonina.

Ya que se planteó evaluar la liberación de ácido glutámico, GABA y serotonina, para este trabajo se optó por la utilización de sinaptosomas obtenidos a partir de cerebro de ratón (**Figura 7**), ya que como lo menciona Mayas en el 2006; los sinaptosomas se han utilizado para comprender los mecanismos neuroquímicos que subyacen a las funciones cerebrales, incluyendo la liberación y receptación de neurotransmisores, la homeostasis, el estudio de segundos mensajeros y el metabolismo energético. Los sinaptosomas se obtuvieron mediante el uso de la técnica reportada por Hajos en 1979, los cuales lograron observarse a un aumento de 4000X en un microscopio electrónico de transmisión. Aun con la observación de dichas estructuras al microscopio, de manera visual no se puede comprobar que estas sean funcionales, por lo que se continuo a las evaluaciones de perfusión.

Una vez obtenidos los sinaptosomas se realizaron ensayos de perfusión mediante la utilización de un control negativo y un control positivo (**Gráfica 1**). Se observó que los sinaptosomas evaluados con el control negativo (medio basal) mostraban una liberación baja de ácido glutámico, GABA y serotonina (aproximadamente 60pg/mg de proteína); mientras que los evaluados con el control positivo (medio de liberación) mostraban una liberación significativa de los tres neurotransmisores (400-500 pg/mg de proteína), esto se debe a que el medio de liberación tiene una concentración 10 veces mayor de potasio con respecto al control negativo (**Tabla 1**) el cual se encuentra involucrado en la despolarización de la membrana (Castro, 2011; Mayas, 2006), esto nos indica que ciertamente los sinaptosomas obtenidos conservan las características funcionales de la pre-sinapsis neuronal, ya que pueden responder a estímulos (Maya, 2019).

Con respecto a los resultados obtenidos en las **gráficas 2 y 3**, se observa que la liberación de serotonina aumenta con forme se aumenta la concentración de extracto metanólico, siendo la mayor concentración de extracto (100µg/ml) en la cual se observa una mayor liberación de este neurotransmisor. Por otra parte, la liberación de ácido glutámico y GABA no se ve afectada en gran medida con el aumento en la concentración de EMAM. Se decidió evaluar únicamente la concentración de 100µg/ml de EMAM, ya que a esta concentración se observa la mayor liberación de serotonina y por la cantidad de extracto que se tenía en ese momento.

Cabe destacar que los resultados obtenidos hasta este punto no fueron analizados estadísticamente, ya que no se realizaron suficientes ensayos, aunque si fueron esenciales para los experimentos que se llevaron a cabo posteriormente.

Al evaluar la concentración de 100µg/ml de EMAM (**Gráfica 8**), se observa que la liberación de ácido glutámico y GABA no es significativa con respecto al control negativo mostrado en la **gráfica 7**. Por otra parte, la liberación de serotonina observada en la **gráfica 8** y la diferencia del porcentaje de liberación de este neurotransmisor con respecto al control negativo indican que, la liberación de serotonina puede verse involucrada con los efectos conductuales observados en roedores anteriormente (González, 2015). Tal y como lo menciona Trueta en el 2012, la liberación de 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), es de gran relevancia en la regulación de estados de ánimo, funciones fisiológicas y conductas en los animales a lo largo de toda la escala filogenética, incluido el ser humano; por lo que la liberación de serotonina observada en este ensayo (**Gráfica 8**), puede estar modificando el estado de ánimo de los roedores, generando un efecto ansiolítico en ellos. Tal y como lo menciona Quentin en el 2018, existe evidencia de que la serotonina se encuentra implicada en la regulación de los rasgos de personalidad y el control del estado de ánimo.

La liberación de serotonina observada pudiera deberse a las altas concentraciones de compuestos químicos dentro del EMAM, entre ellos los flavonoides como la tilianina, que se sabe, es un componente mayoritario en este extracto y al cual se le atribuyen varios efectos terapéuticos del mismo (Hernández, 2011). Por lo que se decidió evaluar a tilianina y su posible efecto de liberación de serotonina; relacionado a un efecto ansiolítico en ratones (González, 2015).

Al observar el efecto de liberación producido por tilianina, se aprecia que las concentraciones de 0.022µM (**Gráfica 13**) y 0.055µM (**Gráfica 14**) producen una liberación de serotonina estadísticamente significativa con respecto al control negativo; mientras que la concentración de

0.11 μ M (**Gráfica 15**) no presenta diferencia estadística en cuanto a la liberación de ninguno de los neurotransmisores evaluados (ácido glutámico, GABA y serotonina). El efecto de liberación de serotonina producido por tilianina que es un flavonoide glicosilado se relaciona a lo descrito por Machado en el 2008, ya que en su trabajo de investigación realizado sobre *Schinus molle* (pirul) se llegó a la conclusión de que la rutina (rutósido, soforina) que es un flavonoide glicosilado obtenido a partir de esta planta, aumentaba la disponibilidad de serotonina en la hendidura sináptica, esto fue observado posterior a los ensayos conductuales en presencia y ausencia de fenclonina, un inhibidor de la triptófano hidroxilasa, enzima limitadora en la biosíntesis de la serotonina.

Con respecto a la liberación de serotonina e independientemente del mecanismo de acción de tilianina, dicho efecto depende de la concentración, aunque esta relación es compleja (Farinde, 2019) y pareciera ser una respuesta de tipo hormética (Calabrese, 2018); ya que se puede apreciar que al aumentar la concentración de tilianina el efecto de liberación de neurotransmisores disminuye (**Gráfica 18**). Este efecto se relaciona a dos posibles causas principalmente, por una parte, pudiera ser que existan interacciones no polares entre las moléculas de tilianina, y al aumentar la concentración de este compuesto dichas interacciones aumentan, disminuyendo la cantidad de fármaco libre para su unión al receptor (Morrison, 2015). Por otro lado, pudiera ser que existan dos tipos de receptores, uno de alta afinidad a tilianina con un efecto de liberación de serotonina y otro de baja afinidad a tilianina, pero con un efecto de inhibición de la liberación de serotonina (autorregulador); con forme se aumenta la concentración de tilianina se saturan los receptores de alta afinidad, por lo que tilianina comienza a unirse al receptor de baja afinidad, lo cual ocasiona la inhibición de la liberación de serotonina a concentraciones elevadas de tilianina (Calabrese, 2018).

En la **gráfica 18** Se aprecia que el porcentaje de liberación de serotonina ocasionada por tilianina (0.022 μ M) es aproximadamente cinco veces mayor con respecto al control negativo, lo cual se pudiera relacionar al efecto ansiolítico mostrado por este compuesto de manera *in vivo* (González, 2015), ya que la serotonina es fundamental para la modulación de la conducta social, las emociones y una gran cantidad de funciones fisiológicas, tales como el sueño y una sensación de bienestar, entre otras (Zhuang, 2018).

González en el 2015 menciona que el efecto de tilianina se ve relacionado a su posible acción como ligando del receptor GABA_A/BZD y no a la unión al receptor 5-HT_{1A}, las evaluaciones que se realizaron en esos ensayos fueron de manera *in vivo*, por lo cual el efecto pudiera ser el observado únicamente de manera postsináptica o de manera integral; por otra parte, los resultados obtenidos

durante los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo de investigación, nos llevan a pensar que el efecto presináptico producido por tilianina, se encuentra relacionado a una liberación de serotonina (**Gráfica 18**). Aunque, el mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo este efecto se desconoce.

Si bien la hipótesis de este trabajo menciona que el extracto metanólico y tilianina aumentarían la liberación de GABA y serotonina en sinaptosomas de ratón, dentro de los resultados no se aprecia una liberación estadísticamente significativa de GABA (**Gráfica 10 y 17**), mientras que en la liberación de serotonina si (**Gráfica 11 y 18**). Dicha hipótesis, se generó con base en los antecedentes directos (González, 2015) y con lo descrito en la literatura (Blough, 2019; Castro, 2017; Quentin, 2018; Zhuang, 2018;) sobre el efecto producido por GABA y serotonina a nivel fisiológico; el efecto de ambos neurotransmisores se relaciona, ya que tanto GABA como serotonina, regulan procesos como, el estado de ánimo y la conducta (Pratelli, 2017; Govindpani, 2017). Dado lo anterior se esperaría que el efecto conductual mostrado de manera *in vivo*, por el extracto metanólico y tilianina, se vería relacionado a la liberación de GABA y/o serotonina; pero basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se puede especular que la liberación de serotonina presináptica está involucrada en el efecto conductual mostrado de manera *in vivo* (González, 2015), y no así la liberación de GABA.

CONCLUSIÓN

9. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos mediante este trabajo, se propone a tilianina como uno de los compuestos presentes en el EMAM, responsable de la actividad ansiolítica demostrada de manera *in vivo*, relacionada a un efecto de liberación de serotonina.

PERSPECTIVAS

10. Perspectivas

- Realizar ensayos *in vitro* en sinaptosomas de cerebro de ratón para determinar el mecanismo de acción de tilianina por el cual se está llevando a cabo la liberación de serotonina.
- Realizar ensayos *in vitro* en rebanadas de cerebro de ratón para conocer si el efecto de tilianina es únicamente presináptico.
- De acuerdo a la observación del efecto de tilianina sobre ácido glutámico sería interesante evaluar un posible efecto de inhibición sobre la liberación de ácido glutámico.

11. Bibliografía

- (1) Abarca, C. (2003). A toxic fraction from *scolopendra* venom increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of crustaceans.
- (2) Alcaraz, R. (2001) Estructura y función del sistema nervioso: Recepción sensorial y estados del organismo. Editorial El manual moderno México, D.F.
- (3) Alzheimer's Association (2016). ¿Qué es la enfermedad de Alzheimer?
- (4) Arizaga, S. (2007). Estudio y Colección Viva de Plantas Medicinales Nativas y Formación de un Banco de Germoplasma del Estado de Michoacán. Informe Final. Centro de Investigaciones en ecosistemas. UNAM-Campus Morelia.
- (5) Bardin L. (2000) Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. Pain.
- (6) Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana UNAM [Revisada agosto 2018]
- (7) Blough, B. (2019) Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Psychopharmacology* 236: 915.
- (8) Browne, C. (2017). Pharmacological Modulation of 5-HT_{2C} Receptor Activity Produces Bidirectional Changes in Locomotor Activity, Responding for a Conditioned Reinforcer, and Mesolimbic DA Release in C57BL/6 Mice. *Neuropsychopharmacology*
- (9) Bustamante, Z. (2007). El sistema nervioso. Desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquia, Colombia.
- (10) Calabrese V. et al. (2018). Hormetic approaches to the treatment of Parkinson's disease: Perspective and possibilities. *J. Neurosci. Res.*
- (11) Carhart, R. (2017). Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *J Psychopharmacol.*; 31(9): 1091–1120.
- (12) Castro, J. (2011). Mecanismo de acción de tiriantina I y ácido tiriantínico II aislados de la raíz de *Ipomea tyrianthina* sobre el sistema GABAérgico en corteza cerebral de ratón.
- (13) Chen, J. et al. (2005) Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur. J. Pharmacol.* 521, 9–20
- (14) Cheng, Z. et al. (2018), Cardioprotection of tilianin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: Role of the apoptotic signaling pathway. 13(3): e0193845.
- (15) Ciranna, L. (2006). Serotonin as Modulator of Glutamate and GABA mediated neurotransmission

- (16) Colgan, L. (2012). Action Potential-Independent and Pharmacologically Unique Vesicular Serotonin Release from Dendrites *J Neurosci.* 32(45): 15737–15746.
- (17) Colton, C.. (2010) Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 9:174–191.
- (18) Commenges, D. (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia *Eur. J. Epidemiol.* 16, 357–363
- (19) David, V. et al. (2008) The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects *Genes. Nutr.* 3, 115–126
- (20) Diwan, AD. (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 16, 5e47
- (21) Epilepsy Foundation (2016). What is epilepsy? Obtenido de Epilepsy Foundation.
- (22) Escobar y Pimienta (2006). Sistema nervioso. Editorial Universidad del Valle, Cali. Colombia.
- (23) Espinosa y Sarukhán. (1997). Manual de malezas del Valle de México. Ediciones Científicas Universitarias UNAM- México, D.F.
- (24) Esquivel, E. (2004) Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. Cromatografía de fase reversa. Universidad Nacional Autónoma de México.
- (25) Estrada, R. (2012) Los flavonoids y el Sistema nervioso central. *Salud Ment* vol.35 no.5 México
- (26) Estrada, S. (2014) Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. 153(1):98-110
- (27) Evans, G. (2015) The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. doi: 10.1101/pdb.top074450
- (28) Farinda, A. (2019) Relacion dosis-respuesta. Columbia Southern University, Al.
- (29) FEP. (2016) Sobre el Parkinson. Obtenido de Federación Española de Parkinson.
- (30) González (2012) Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta médica.* 78(8): 793-796.
- (31) Gonzalez, T. et al. (2015) Depressant effects of *Agastache mexicana* methanol extract and one of major metabolites tilianin *Asian Pac J Trop Med.* 8(3):185-90
- (32) Govindpani, K. (2017). Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease *Int J Mol Sci.* 18(8): 1813.
- (33) Gutiérrez (1989). Influence of pipercolic acid on the release and uptake of [3H]GABA from brain slices of mouse cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 14:405-408
- (34) Hajos, et al. (1979) The effect of ethanol on the distribution of synaptic vesicles in cortical synaptosomes of the rat.

- (35) Harada (2015) Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain. *Front Neurosci.* 9:499
- (36) Harborne, J. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids Vol 1.* Wiley Europe
- (37) Heneka (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388–405.
- (38) Hernández O. (2009) Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology.* 78: 54–61.
- (39) Hull EM, Lorrain DS, Du J, Matuszewich L et al. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res* 105:105-116.
- (40) Infante, R. (1997) *Clin. Invest. Arterioesclerosis.* 9, 19-22
- (41) Jacobs B. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72:165-229.
- (42) Jhon Van Eldik-Linda et. al. (2016) The roles of inflammation and immune mechanisms in Alzheimer's disease. *Alzheimer and dementia: Translational research* 29067297
- (43) Jovanovic (1998) Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: Rice Evans C, Parker L (eds.): *Flavonoids in health and disease.* Marcel Dekker, Nueva York, 137-161
- (44) Karan, G. (2017) Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease *Int J Mol Sci.* 18(8): 1813.
- (45) Kimelberg H (2010) Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 7:338–353.
- (46) Lowry O. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* 193: 265-275
- (47) Lu, Cheng-Wei, et al. (2017). Ciproxifan, a histamine H3 receptor antagonist and inverse agonist, presynaptically inhibits glutamate release in rat hippocampus. *Toxicology and applied pharmacology.*
- (48) Luo, Y (2002) Inhibition of amyloid- β aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 12197–12202
- (49) Machado D. (2008) Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems
- (50) Manach, C. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747

- (51) Maya, M (2019) A Cannabinoid Receptor-Mediated Mechanism Participates in the Neuroprotective Effects of Oleamide Against Excitotoxic Damage in Rat Brain Synaptosomes and Cortical Slices.. *Neurotox*
- (52) Mayas, D. (2006) Modificaciones calcio dependientes de radicales libres en sinaptosomas de corteza frontal de ratón por la ingesta crónica de alcohol.
- (53) McCormick D. (1989) GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *Neurophysiol.* 62 (5): 1018-27.
- (54) Monroy & Castillo. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. CONABIO, CIB y CEIB, UAEM.
- (55) Morales I. (2010). La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.
- (56) Morrison. (2015). Química orgánica, quinta edición. Editorial Pearson.
- (57) Möhler H. (2009) Role of GABAA receptors in cognition. *Biochem. Soc. Trans.* 37:1328–1333. doi: 10.1042/BST0371328.
- (58) Nicholls D. (1998) Presynaptic modulation of glutamate release *Prog. Brain Res.*, 116. 15-22
- (59) OMS (2008) Trastornos neurológicos: un serio desafío para la salud pública en las Américas y en todo el mundo. Obtenido de Organización Mundial de la Salud.
- (60) OMS (2017) Demencia. Obtenido de Organización Mundial de la Salud.
- (61) OMS (2017) El número de personas que padece demencia se triplicara en los próximos 30 años. Obtenido de Organización Mundial de la Salud.
- (62) Pratelli, M. (2017). Perturbation of Serotonin Homeostasis during Adulthood Affects Serotonergic Neuronal Circuitry *eNeuro.* 4(2): 0376-16.
- (63) Peters, Palay and Webster. (1978) The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. W.B. Saunders company. Philadelphia.
- (64) Prosser RA, Miller JD, Heller HC. A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain* 534:336-339.
- (65) Quentin, Emily. (2018) Somato-Dendritic Regulation of Raphe Serotonin Neurons; A Key to Antidepressant Action
- (66) Raleigh MJ, McGuire MT, Brammer GL, Pollack DB et al. Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Res* 559:181-190.
- (67) Racefyn U. (2008). Revisión Académica “La inflamación”

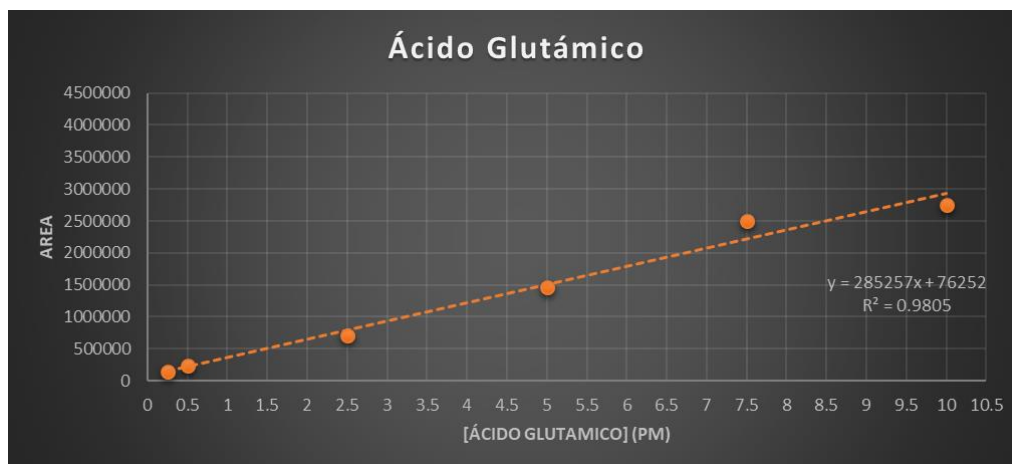
- (68) Romero F. Ludwig V. (2015). Anatomía y fisiología del sistema nervioso. The Little French eBooks, Francia.
- (69) Rzedowski (2010). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- (70) Saller CF, Stricker EM. Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science* 192:385-387.
- (71) Santillán M. (2008) Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79: 513- 524.
- (72) Schafer D. (2015) Microglia function in central nervous system development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7: a020545.
- (73) Schmitz D. (1995) Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca²⁺ entry. *Brain Res*. 701(1-2):249–54.
- (74) Tansey M. (2015) Inflammation in nervous system disorders. Introduction. *Neuroscience*. 302:1.
- (75) Tremblay M. (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8: 1000-527.
- (76) Trueta C. (2012) Regulación de la liberación de serotonina en distintos compartimientos neuronales. *Salud Ment* vol.35 no.5 México
- (77) Utan G. (2018). El sistema Nervioso Central y sus implicaciones a nivel fisiológico.
- (78) Universidad Técnica de Ambato (2016). Revisión Académica “Mediadores de la inflamación”
- (79) Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- (80) Weiger WA. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72:61-95.
- (81) Youdim, K.A. y Joseph, J.A. (2001) *Free. Radic. Biol. Med.* 30, 583–594
- (82) Zangrossi H (2014) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 25:637-645.
- (83) Zhuang, X. (2018) Platelet serotonin and serotonin transporter as peripheral surrogates in depression and anxiety patients. *European Journal of Pharmacology* vol. 834

ANEXOS

12. Anexos

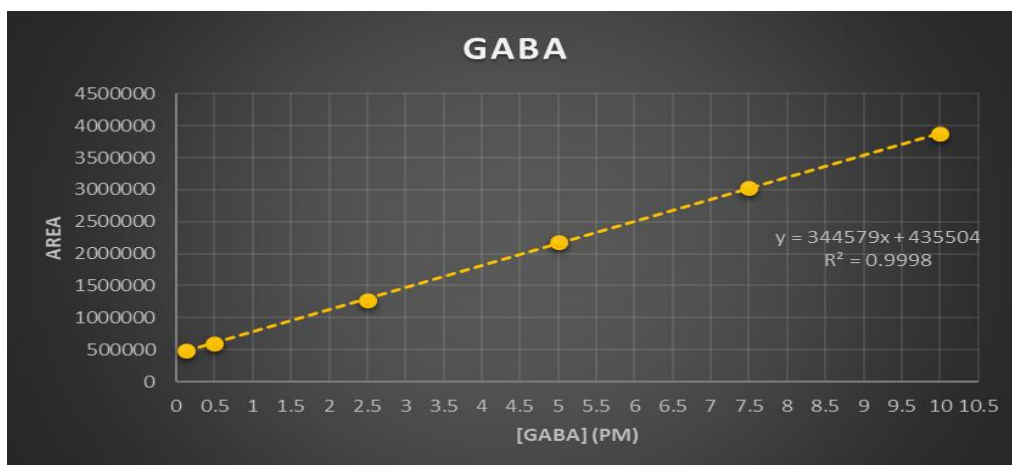
Anexo 1. Cuantificación de la liberación de neurotransmisores

Para llevar a cabo la cuantificación de neurotransmisores liberados por el EMAM y tilianina, se obtuvieron las siguientes curvas estándar (**Gráfica 19, 20 y 21**).



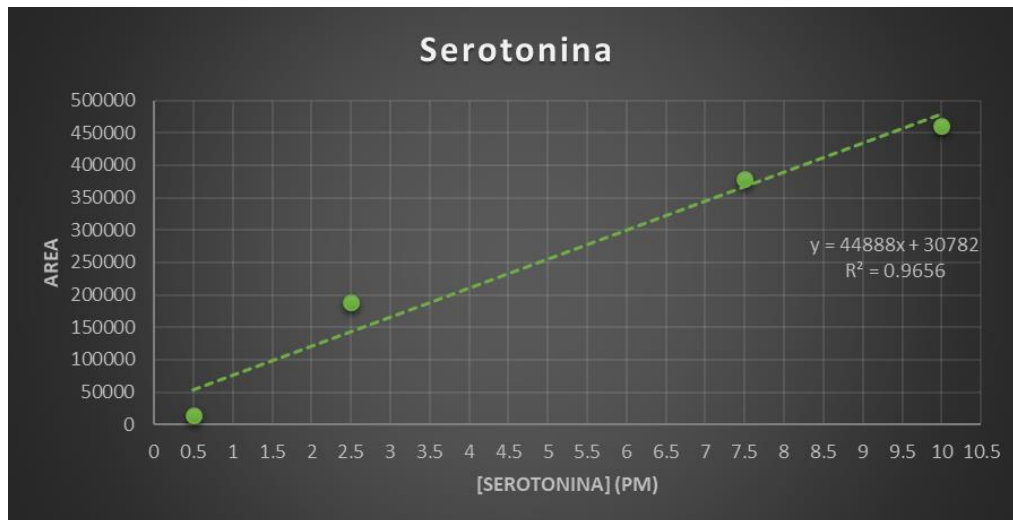
Gráfica 19. Curva estándar de ácido glutámico.

Obtenida a partir de diferentes concentraciones (0.5, 2.5, 5, 7.5 y 10pmol) de ácido glutámico.



Gráfica 20. Curva estándar de GABA.

Obtenida a partir de diferentes concentraciones (0.5, 2.5, 5, 7.5 y 10pmol) de GABA.



Gráfica 21. Curva estándar de serotonina.

Obtenida a partir de diferentes concentraciones (0.5, 2.5, 7.5, 10pmol) de serotonina.

En las **gráficas 19, 20 y 21** podemos observar las curvas estándar de ácido glutámico, GABA y serotonina respectivamente; a partir de las cuales se obtuvo la ecuación de la recta para cada neurotransmisor, con la cual se pudieron realizar los cálculos correspondientes para obtener la concentración de neurotransmisores por miligramo de proteína de sinaptosoma.

$$Y=mX+b \quad \text{por lo tanto} \quad X= (Y-b)/m$$



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 20-03-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Evaluación *in vitro* del efecto del extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro de ratón

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR VICENTE RODRIGUEZ WILSON**

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

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Torre de Laboratorios (Ceib).
Tel. (777) 329 7057, ceib@uaem.mx, <http://www.uaem.mx/ceib/>

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Centro de Investigación en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 20-03-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Evaluación *in vitro* del efecto del extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro de ratón

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR VICENTE RODRIGUEZ WILSON**

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



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 20-03-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Evaluación *in vitro* del efecto del extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro de ratón

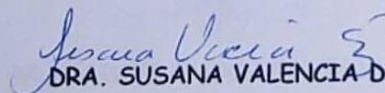
Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR VICENTE RODRIGUEZ WILSON**

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

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Torre de Laboratorios (CeIB),
Tel. (777) 329 7057, ceib@uaem.mx <http://www.uaem.mx/ceib/>

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 20-03-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Evaluación *in vitro* del efecto del extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro de ratón

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR VICENTE RODRIGUEZ WILSON**

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. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Torre de Laboratorios (Ceib),
Tel. (777) 329 7057, ceib@uaem.mx <http://www.uaem.mx/ceib/>

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de Investigación en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 20-03-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Evaluación *in vitro* del efecto del extracto metanólico y tilianina obtenidos de *Agastache mexicana* sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro de ratón

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR VICENTE RODRIGUEZ WILSON**

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. FERNANDO MARTINEZ MORALES

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2020-06-01 09:58:37 | Firmante

laZO1qSFsrWvflnAfi/nU/oMN45QHq5c5P6Yzu/nLPlpd+hWyHQU1KfHs5HMMmVBtp8/M2Njn12+eJRFC2F88FCe9HwA+FF8yNbzYrVk/Z7f
OpfvoSdvHl0vQko5drK7vsRT2Mlv
YRgrhOPwz18bR55cjxetp+BSaMl2mwFWfAdd/cXO3q7se9OoLjClnEmNQH9vMEpxHs9b1SKKAv1ItD0/PK9kveBDiUoc0NX6nO4S7RIYNx/6IA
K8SRAFrJBbslqfUxzmST8WzZo
Eoi+QYJfO5BhK9H2FU5wPqaKFbD9KM78tT2ce5YUQQ9fs1WLMRK2j+jLurf5ZP6Bk4gw==

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2020-06-01 10:46:02 | Firmante

Ot3aEcRZouc6wWAZl/2X4NgHqJS60T+voL43MeHzjeflo9jo2kVfyDrvkGr6uwCx4rv6fIOcks2niZqCHzKxUoa+Un8KufMvMMPkTcX6g586qOpX
mOmD3fi8ghn4OoTX+yvfp/ps/30
MH6JxAEiyFzZfhKr3SxoxoOcjS9XxQ53zYJL3Vz6EjTzyVsNuWS7y+1shiLtJaZvk3H2rIGWbstqC2qgd80Zk0g9kGelRdnE7Aml6p1x9bQMPHK
TICaDwlqznYJEX986cZVeOQBrea
GPHSzbkU2ipisG7s7140SnWScEvK0l2YOsHJLUJ2cPQV6H+ySvCLIOsAe1TdcTw==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2020-06-01 15:56:46 | Firmante

uTavQjuScVcmpNm3Tl7PW8lJgFu3OSAzwabo2UwWklbTbcSCOOvXQQBrihqZnSIN5PgG8k/JnOEf4S8BBkKey/ryb6JgVHV9ZrtJj0cgLcX5h8G
zGcPzQei9V6ApOk01VICrmTxHu
oo4MwoiXM29yL6ZjQ1B2MpliA+ecORTVynYTz6kxkfs+vPZrmmEE2gUuXMBhQk0lOR9ar4ccQgQmTCqyEN7lqz6ttNfkqd7fUue8srlyBjagOaZy
KRmnGuJvCx/BWfUc8a/J19Bz7l
K+EMnDTfrMfIOocwQx4u2cHBSzMaJxA2xhdo28iJ1Q21bWINn3JgUixBzMbGO+i2lg==

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2020-06-01 18:44:38 | Firmante

DeTuQf8SEVTew/fAEI+99X76LWYHE3FodMLFe2FFG6mUpXm7OJdSGGWo1JUsojMDtkf/RLP1mxcQGT5y+8G3rGh5Os7MqjRc2P/8W+v
NRfMtYKFtg2RD6XKe/81CcY9WE
LjXlUgFfWwZYtXXHDV11bpvuRurA0baoMmiRazeDk5BB1xNhnY93dTBEHJ4fCpAVGaj8vkqpx9+jnJ6yQMMP2mvsjfadrcGFEOaVVMdi/zX
47nwzjBPTiE/mm6pU7Md7Di+ao6
8EckOrtqyeXbv6ZNXy2JUdGNWolnt7mjRkljJwyUoRzam4UEhaGrVcb3q1QqvPuF1k7cZ+r8m/A==

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2020-06-01 19:08:18 | Firmante

IU6tnWUEhPoxKaJbfpz/HB6CwBesSlrEPls9uhodVo9Wm7BOgjOvMgd2RW4vx64p4jYL89RRC2U9yFifnCbaMLMutCmkKTGAeFaSWQdTEN
pE4VZjOQaNogWwWsiqN81RkbbY
wnZZDfrnr/3UQaZaTctxFZLuiag8KU5ypFMf1nTpOk+++1s7660gdkKp2+k8UVfOBorBCi1UCcKua/hjRr0UxjFaN5l/hQRXvmhw4OhFCVbet8F
6H2YuldQ3DP6RNM2VsRfKnKG/h
zDoFiDEJWkMcSQLLeJ5iin8Js1TIITmCtR4002vFfSjv7BrosGgBWR2dCD7JaAcYqncePFPg==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

19HXKF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qi2ML3hic3i2LK194yh5yLwAzCIWZwrX>