



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**OBTENCIÓN DE FTÁLIDAS NATURALES Y SEMISINTÉTICAS Y SU  
EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS Y  
NEUROPROTECTORES CONTRA ISQUEMIA CEREBRAL**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**GERALDINA MAYELA DEL ÁNGEL MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. E. GUILLERMO DELGADO LAMAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTOR**  
**DR. RICARDO REYES CHILPA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**DR. CAMILO RÍOS CASTAÑEDA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE DEL 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 1-C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Bajo la dirección del Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

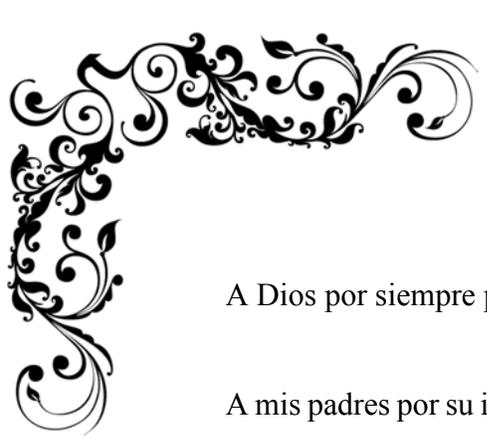
Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo de CONACYT (Beca escolar con registro No. 207474) y de la UNAM (Proyecto IG200514).



## *Agradecimientos*

- A mi tutor el Dr. Guillermo Delgado Lamas, que siempre me brindó su apoyo, consejo y guía y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.
- Al Dr. Camilo Ríos por permitirme realizar una parte de mi trabajo en su laboratorio y por su guía.
- Al Dr. Ricardo Reyes, integrante de mi Comité Tutorial, por sus sugerencias en la realización de este trabajo.
- A los Integrantes del Jurado, la Dra. Selva Rivas, la Dra. María de la Luz Navarro, la Dra. Irma Romero y el Dr. Rudolf Buijs por su tiempo y sugerencias.
- Al M. en C. Antonio Nieto y a la M. en C. Teresa Ramírez por su apoyo en la realización de este proyecto.
- A la Coordinación de Estudio de Posgrado y al Posgrado en Ciencias Biomédicas.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la UNAM por el apoyo financiero
- A la UNAM por permitirme realizar un sueño en esta maravillosa casa de estudios.





## *Agradecimientos especiales*

A Dios por siempre ponerme en el lugar y momento correctos.

A mis padres por su infinito apoyo y amor incondicional, por inculcarme las ganas y la pasión al hacer las cosas y por enseñarme y alentarme a volar, mami, papi gracias a ustedes soy la persona de hoy. A mis hermanos por siempre apoyarme y alentarme, los amo y los he extrañado infinitas veces. A mi tía Mague, gracias por darme su apoyo y por ser mami postiza, por siempre escuchar.

A Miye, gracias por ser mi mamá gallina, por tus enseñanzas académicas y en la vida, gracias por el infinito apoyo que no tengo manera de agradecer, por tantas pláticas y risas. Gracias por todo, te quiero.

Ale gracias por tu apoyo, por tu guía y sobre todo por tu amistad, por ser esa personita que siempre tiende una mano desinteresada, te quiero.

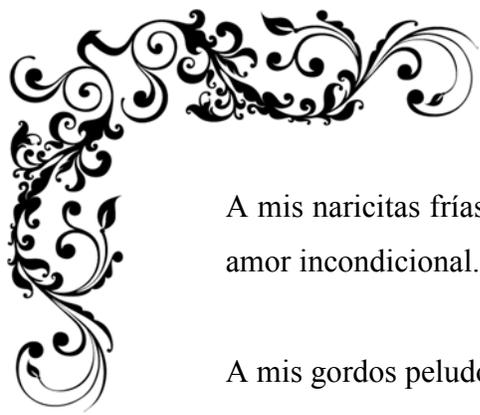
Memolesto, Ade, José Luis chiquito, Blanquita, Eu, Oscar, Luis, gracias por compartir su amistad, su tiempo, sus risas y a veces llanto conmigo, gracias por escucharme, ha sido un placer conocerlos y quererlos.

Faby, vuela, vuela alto y cumple tus sueños. Muchas gracias por la corta, hasta ahora, pero intensa amistad.

José Luis, Arturo, Don Fer y a mis compañeros del laboratorio 1-C y de Neuroquímica muchas gracias por su apoyo y amistad y por compartir gratos y a veces duros momentos conmigo.

Chuchis, Yessi, Brendiux, Yaha, Abdieel, por la amistad a través de los años y a veces a la distancia, los quiero chicos.





A mis naricitas frías, a mi viejito y a la Pora por soportar mis tiempos de ausencia y por su amor incondicional.

A mis gordos peludos porque sin ellos esta tesis no se llevaría a cabo.

Muchísimas gracias a todos.



*A mis padres José Del Ángel  
y  
María Martínez  
con amor ♥*

---

---

## Contenido

Contenido	Página
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	vi
Lista de abreviaturas y acrónimos.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
1. Antecedentes.....	1
1.1 El uso de las plantas con fines terapéuticos.....	1
1.2. <i>Ligusticum porteri</i> Coult & Rose.....	2
1.3. Ftálicas y otros constituyentes de <i>Ligusticum porteri</i> Coult & Rose.....	5
1.4 Actividad biológica de ftálicas y otros constituyentes de <i>Ligusticum porteri</i> Coult & Rose.....	6
1.5. Inflamación.....	7
1.6 Accidentes cerebrovasculares.....	12
1.6.1. Isquemia cerebral con reperfusión.....	12
2. Justificación.....	20
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
5. Estrategia experimental y métodos.....	23
5.1 Aislamiento de los productos naturales y derivados semi-sintéticos.....	23
5.1.1. Preparación de cetoácido de toquinólida B (7).....	24
5.1.2. Preparación de ciclotoquinólida B (8).....	24
5.1.3. Preparación de cetoéster de toquinólida B (9).....	24
5.1.4. Preparación de desmetilwallichílida (10) y dicetodiácido de diligustílida (11).....	25
5.1.5. Preparación de desmetilwallichílida (10).....	25

---

---

---

5.1.6. Preparación de producto de condensación de diligustílida (12).....	26
5.2. Bioevaluaciones.....	26
5.2.1. Edema en oreja de ratón inducido con TDF.....	26
5.2.2. Edema en la pata trasera de ratón inducido con carragenina.....	27
5.2.3. Actividad de la enzima mieloperoxidasa.....	28
5.2.4. Análisis histológico del tejido de la oreja.....	29
5.2.5. Análisis de la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 <i>in vitro</i> .....	29
5.2.6. Evaluación de nitritos <i>in vitro</i> .....	30
5.2.6.1. Cultivo celular.....	30
5.2.6.2. Concentración de nitritos.....	30
5.2.6.3. Viabilidad celular.....	31
5.2.7. Actividad neuroprotectora <i>in vitro</i> .....	31
5.2.7.1. Disección e inducción de isquemia/reperfusión en rebanadas estriatales.....	31
5.2.7.2. Evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.....	32
5.2.8. Actividad neuroprotectora <i>in vivo</i> .....	33
5.2.8.1. Modelo de oclusión de la arteria cerebral media y tratamiento.....	33
5.2.8.2. Evaluación de los déficits neurológicos.....	35
5.2.8.3. Análisis histológico, determinación del área de la lesión.....	36
5.2.8.4. Actividad de la enzima mieloperoxidasa.....	36
5.2.8.5. Actividad de la enzima caspasa-3.....	37
5.2.9. Análisis estadístico.....	37
6. Resultados.....	38
6.1. Obtención de los constituyentes de <i>Ligusticum porteri</i> y de los derivados semi-sintéticos.....	38
6.2. Actividad antiinflamatoria de los productos naturales y derivados semi-sintéticos en el modelo de edema inducido con TDF.....	43

---

---

6.3. Actividad antiinflamatoria de los derivados semi-sintéticos en el modelo de edema inducido con carragenina.....	45
6.4. Actividad inhibidora de la infiltración leucocitaria de los derivados semi-sintéticos en el modelo de TDF.....	47
6.5. Inhibición de la actividad de la COX-1 y -2 con enzima pura.....	50
6.6. Inhibición de la producción de nitritos y viabilidad celular en cultivo de células de macrófagos.....	51
6.7. Efecto inhibitorio de los productos naturales de <i>Ligusticum porteri</i> sobre la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa.....	52
6.8. Efecto inhibitorio de las ftálicas semi-sintéticas de <i>Ligusticum porteri</i> sobre la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa.....	54
6.9. Efecto de la ftálica semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre el déficit neurológico causado por isquemia/reperfusión.....	59
6.10. Efecto de la ftálica semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre el daño causado por isquemia/reperfusión.....	60
6.11. Efecto de la ftálica semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre la actividad de la enzima MPO en un modelo de isquemia/reperfusión...	64
6.12. Efecto de la ftálica semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre la actividad de caspasa-3 en un modelo de isquemia/reperfusión.....	65
7. Discusión.....	68
8. Conclusiones.....	80
9. Referencias bibliográficas.....	81

---

### *Índice de Figuras*

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Fuentes de obtención agentes terapéuticos (1981-2010).....	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Planta y raíces de <i>Ligusticum porteri</i> Coult & Rose.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura y numeración de una ftálica.....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Algunos productos naturales aislados a partir de las raíces de <i>Ligusticum porteri</i> , (1-4 ftálicas). ....	<b>6</b>

---

---

<b>Figura. 5.</b> Derivados semi-sintéticos.....	<b>7</b>
<b>Figura. 6.</b> Biosíntesis de las prostaglandinas G <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> .....	<b>9</b>
<b>Figura 7.</b> Actividad de la enzima mieloperoxidasa.....	<b>10</b>
<b>Figura 8.</b> Actividad de la enzima sintasa del óxido nítrico (SON).....	<b>11</b>
<b>Figura 9.</b> Mecanismos que contribuyen al daño durante la isquemia/reperfusión en el cerebro.....	<b>13</b>
<b>Figura 10.</b> Tipos de muerte celular en el centro y penumbra isquémica.....	<b>18</b>
<b>Figura 11.</b> Esquema del modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM).....	<b>35</b>
<b>Figura 12.</b> Condiciones para la obtención de los derivados semi-sintéticos a partir de diligustílida (2).....	<b>39</b>
<b>Figura 13.</b> Condiciones para la obtención de los derivados semi-sintéticos a partir de toquinólida (3).....	<b>40</b>
<b>Figura. 14.</b> Efecto de las ftálicas naturales y derivados semi-sintéticos en el edema inducido con TDF en oreja de ratón.....	<b>43</b>
<b>Figura. 15.</b> Dosis-respuesta para el efecto de las ftálicas semi-sintéticas en la inflamación inducida por TDF.....	<b>44</b>
<b>Figura. 16.</b> Efecto de las ftálicas semi-sintéticas en el edema causado por carragenina.....	<b>45</b>
<b>Figura. 17.</b> Gráficas dosis-respuesta para las ftálicas semi-sintéticas en la inhibición de la actividad de la enzima MPO.....	<b>46</b>
<b>Figura. 18.</b> Efecto de las ftálicas semi-sintéticas en el espesor de la oreja de ratón después de la administración del TDF.....	<b>47</b>
<b>Figura. 19.</b> Micrografías representativas de cortes transversales de orejas de ratón administradas con TDF y las respectivas ftálicas, teñidas con hematoxilina-eosina.....	<b>48</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto de las ftálicas semi-sintéticas en el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares en tejido de oreja de ratón después de la administración del TDF.....	<b>50</b>
<b>Figura. 21.</b> Efecto de las ftálicas semi-sintéticas en las actividades de las enzimas COX-1 y -2 en un ensayo con enzima pura.....	<b>51</b>
<b>Figura. 22.</b> Efecto dependiente de la concentración de las ftálicas semi-sintéticas en: (A) la inhibición de la producción de nitritos en los sobrenadantes de cultivo	

---

---

de células RAW 264.7 de macrófagos estimulados con LPS y (B) en la viabilidad celular.....	52
<b>Figura. 23.</b> Efecto de los productos naturales 1-6 en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperfusión.....	53
<b>Figura. 24.</b> Efecto de las ftálidas semi-sintéticas 7-12 en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperfusión.....	55
<b>Figura. 25.</b> Efecto de la ftálida semi-sintética ciclotoquinólida B (8) en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperfusión.....	56
<b>Figura. 26.</b> Efecto de la ftálida semi-sintética desmetilwallichílida (10) en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperfusión.....	57
<b>Figura. 27.</b> Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperfusión.....	58
<b>Figura. 28.</b> Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en el déficit neurológico de ratas con isquemia/reperfusión.....	60
<b>Figura. 29.</b> Porcentaje del área del infarto de ratas con isquemia/reperfusión a las cuales se les administró el dicetodiácido de diligustílida (11).....	61
<b>Figura. 30.</b> Micrografías representativas de cortes coronales de cerebros isquémicos de ratas tratadas con dicetodiácido de diligustílida (11).....	62
<b>Figura. 31.</b> Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en la actividad de la enzima mieloperoxidasa en ratas 48 h después de la isquemia..	64
<b>Figura. 32.</b> Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en la actividad de la enzima caspasa-3 en ratas, 24 y 72 h después de la isquemia...	66
<b>Figura 33.</b> Ftálidas más activas en el modelo de edema inducido con TDF.....	70
<b>Figura 34.</b> Estructura de las ftálidas monoméricas Z-ligustílida y Z-butilidenftálida.....	72
<b>Figura 35.</b> Productos naturales más activos en el modelo de liberación de LDH....	75

---

---

<b>Figura 36.</b> Derivados semi-sintéticos más activos en el modelo de liberación de LDH.....	<b>76</b>
--	-----------

---

### *Índice de Tablas*

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de <i>Ligusticum porteri</i> .....	<b>3</b>
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento de los productos naturales obtenidos (g) con respecto a la raíz.....	<b>38</b>
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento de la obtención de los productos semi-sintéticos (mg).....	<b>40</b>
<b>Tabla 4.</b> R <sub>y</sub> obtenido para los productos naturales y derivados semi-sintéticos.....	<b>41</b>
<b>Tabla 5.</b> Condiciones para la preparación de derivados semi-sintéticos empleando microondas.....	<b>42</b>
<b>Tabla 6.</b> Resumen de las actividades biológicas y porcentajes de inhibición obtenidos.....	<b>67</b>

---

---

---

## *Lista de abreviaturas y acrónimos*

- ADN ácido desoxirribonucleico
- ABC área bajo la curva
- ANOVA análisis de varianza de una vía
- AMPA propionato de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
- ATP trifosfato de adenosina
- CE<sub>50</sub> concentración efectiva 50
- Cl<sup>-</sup> cloruro
- COX ciclooxigenasa
- CSIM complejo de señalización inductor de muerte
- DI<sub>50</sub> dosis inhibitoria 50
- DMSO- sulfóxido de dimetilo
- DO densidad óptica
- EEM error estándar de la media
- ERO especies reactivas de oxígeno
- FADM Fas-asociado al dominio de muerte
- FAP factor activador de plaquetas
- FCT- $\alpha$  factor de crecimiento transformante- $\alpha$
- FCT- $\beta$  factor de crecimiento transformante- $\beta$
- FDA US Food and Drug Administration
- FEC-GM factor estimulador de colonias granulocito macrófago
- FNT- $\alpha$  factor de necrosis tumoral  $\alpha$
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peróxido de hidrógeno
- HCl ácido clorhídrico
- HOCl ácido hipocloroso.
- IL interleucina
- i.p. intraperitoneal
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fosfato de potasio monobásico
- LDH lactato deshidrogenasa
- LPMN leucocitos polimorfonucleares
- LPS lipopolisacárido

- 
- MEMD medio esencial modificado Dulbecco
  - min minuto
  - MPO mieloperoxidasa
  - MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
  - NaCl cloruro de sodio
  - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> carbonato de sodio
  - NADH dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
  - NADP<sup>+</sup> dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
  - NADPH dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (forma reducida)
  - NADPH oxidasa oxidasa del dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (forma reducida)
  - NaNO<sub>2</sub> nitrito de sodio
  - NaOH hidróxido de sodio
  - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sulfato de sodio
  - NO óxido nítrico
  - NMDA N-metil-D-aspartato
  - O<sub>2</sub><sup>·-</sup> radical anión superóxido
  - OACM oclusión de la arteria cerebral media
  - ONO<sub>2</sub><sup>-</sup> peroxinitrito
  - ONO<sub>2</sub>H ácido peroxinitroso
  - PGG<sub>2</sub> prostaglandina G<sub>2</sub>
  - PGH<sub>2</sub> prostaglandina H<sub>2</sub>
  - PTPm poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
  - s segundo
  - TDF acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol
  - THF tetrahidrofurano
  - tPA activador tisular del plasminógeno
  - TPm transición de la permeabilidad mitocondrial
  - URF unidades relativas de fluorescencia
  - SON sintasa del óxido nítrico
  - XO xantina oxidasa

---

---

## Resumen

Las plantas han sido usadas con diversos propósitos desde el inicio de la humanidad, dentro de los cuales se encuentran los usos terapéuticos. En los últimos siglos el interés se ha enfocado en aquellas plantas que se emplean tradicionalmente con fines medicinales en búsqueda de las sustancias responsables de los efectos.

En México, de acuerdo al Instituto Nacional Indigenista (INI), existen aproximadamente 3,103 especies de plantas usadas en la medicina tradicional. *Ligusticum porteri* es una planta que crece al sur de Estados Unidos y al norte de México, a lo largo de la Sierra Madre Occidental. *L. porteri* es considerada uno de los remedios medicinales más importantes en las zonas donde se encuentra la planta. Sus rizomas se emplean para hacer diversas preparaciones que se usan contra enfermedades gastrointestinales, dolores de cabeza y fiebre, entre otros. Se han aislado diversos constituyentes de la planta, entre ellos se encuentran las ftálicas Z-ligustílida, Z-butilidenftálica, diligustílida (levistólido A), toquinólida y riligustílida. Además se han aislado otros productos naturales como el ácido ferúlico, isovainillina, ferulato de coniferilo y  $\beta$ -sitosterol. Algunos de estos constituyentes como Z-ligustílida, Z-butilideneftálica, diligustílida, toquinólida, riligustílida y ácido ferúlico han sido evaluados y han probado tener diversas actividades biológicas, aunque las investigaciones se han centrado principalmente en la exploración de la actividad biológica de Z-ligustílida y Z-butilidenftálica, los constituyentes mayoritarios de la planta. Se han realizado estudios sobre la reactividad química de las ftálicas, obteniendo derivados semi-sintéticos y evaluando su actividad biológica. Considerando que existe gran interés en la exploración de la actividad biológica de los productos naturales y sus derivados semi-sintéticos, debido a que constituyen una fuente importante para la búsqueda de nuevos agentes que puedan ser empleados en la terapéutica, en este proyecto se evaluó la actividad de diversas ftálicas y otros constituyentes de la planta *L. porteri*, además de algunos derivados semi-sintéticos, en dos modelos de inflamación *in vivo* y en un modelo *in vivo* e *in vitro*, para evaluar la actividad neuroprotectora contra el daño producido por isquemia con reperusión.

---

La importancia de la búsqueda de agentes antiinflamatorios y neuroprotectores contra isquemia cerebral con menores efectos secundarios es insoslayable. En el caso de los agentes contra isquemia cerebral, no existe ninguno aprobado por la Agencia de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso, a excepción del activador tisular del plasminógeno, el cual es un agente trombolítico; sin embargo, su uso tiene una ventana terapéutica pequeña. En las evaluaciones realizadas en este estudio, respecto a la actividad antiinflamatoria, las ftálicas semi-sintéticas fueron más activas comparadas a las ftálicas naturales. De las ftálicas semi-sintéticas, el dicetodiácido de diligustílida, el producto de condensación de diligustílida y la ciclotoquinólida B fueron los compuestos que presentaron mejor actividad. En el modelo *in vitro* de neuroprotección, los productos naturales Z-ligustílida y el ácido ferúlico, de los derivados semi-sintéticos, el cetoácido de toquinólida B, la desmetilwallichílida y la ciclotoquinólida B, resultaron más activos. Sin embargo, en el modelo *in vivo* de neuroprotección la ftálica evaluada, el dicetodiácido de diligustílida no tuvo efecto protector contra la isquemia con reperusión y pareciera incrementar el daño en las células.

Como conclusión de éste proyecto podemos afirmar que las ftálicas semi-sintéticas, el dicetodiácido de diligustílida, el producto de condensación de diligustílida y la ciclotoquinólida B poseen actividad antiinflamatoria, principalmente mediante la inhibición del reclutamiento de neutrófilos y la actividad de la enzima mieloperoxidasa. En la evaluación neuroprotectora, la Z-ligustílida, el ácido ferúlico, el cetoácido de toquinólida B, la desmetilwallichílida y la ciclotoquinólida B fueron protectoras contra el daño causado por isquemia con reperusión.

---

---

## *Abstract*

Plants have been used for various purposes since the beginning of humanity, including the therapeutic uses. In recent centuries interest has focused on plants that have been traditionally used for medicinal purposes in the search of substances responsible for the effects.

In Mexico, according to the Instituto Nacional Indigenista (INI), there are approximately 3,103 species of plants used in Mexican traditional medicine. *Ligusticum porteri* is a plant that grows in southern United States and northern Mexico, along the Sierra Madre Occidental. *L. porteri* is considered one of the most important medicinal remedies in the areas where the plant is found. The rhizomes are employed in some preparations against gastrointestinal illnesses, headaches and fever, among others. Some constituents of the plant have been isolated, including *Z*-ligustilide, *Z*-butylidenephthalide, diligustilide (levistolide A), tokinolide and riligustilide. There are also other natural products isolated from the plant, such as ferulic acid, vanillin, coniferyl ferulate and  $\beta$ -sitosterol. Some of these constituents as *Z*-ligustilide, *Z*-butylidenephthalide, diligustilide, tokinolide, riligustilide, and ferulic acid have been tested and have proven to possess diverse biological activities, although investigations have been mainly focused on the biological activities of the major metabolites of the species, *Z*-ligustilide and *Z*-butylidenephthalide. Some studies have evaluated the chemical reactivity of phthalides, obtaining semi-synthetic derivatives and evaluating their biological activity. Considering the interest in the exploration of the biological activity of the natural products and of the semi-synthetic derivatives, since they constitute an important source for the search of new agents which could be used in therapeutics, in this project the bioactivities of several natural compounds and some semi-synthetic derivatives from *L. porteri* were evaluated in two *in vivo* models of inflammation, and in one *in vivo* and *in vitro* model, to test the neuroprotective activity against ischemia reperfusion injury.

The importance of searching anti-inflammatory and neuroprotective agents against cerebral ischemia with less side effects can not be underestimated. In the case of agents against brain ischemia, there are only one agent approved by the FDA, the tissue plasminogen activator, a thrombolytic oligopeptide with a small therapeutic window. The evaluations performed in this study to test the anti-inflammatory effect of the phthalides, showed that the semi-

---

synthetic phthalides were more active than the natural phthalides. The semi-synthetic compounds the diketodiacid of diligustilide, the condensation product of diligustilide, and the cyclotokinolide B displayed the major activity. In the *in vitro* neuroprotection model, the natural products *Z*-ligustilide, and the ferulic acid, and from the semi-synthetic derivatives, the ketoacid of tokenolide B, the demethylwallichilide and the cyclotokinolide B were more active. However, in the model of neuroprotection *in vivo* the evaluated phthalide, the diketodiacid of diligustilide had no protective effect against brain ischemia, and seems to increase the damage in the cells.

As conclusion we can state that the semi-synthetic phthalides diketodiacid of diligustilide, condensation product of diligustilide, and cyclotokinolide B display anti-inflammatory activity, mainly inhibiting the neutrophil recruitment and the activity of the myeloperoxidase enzyme. The neuroprotective evaluation showed that *Z*-ligustilide, ferulic acid, ketoacid of tokenolide B, demethylwallichilide and cyclotokinolide B were protective against the ischemia/reperfusion injury.



## *Antecedentes*

---

---

## 1. *Antecedentes*

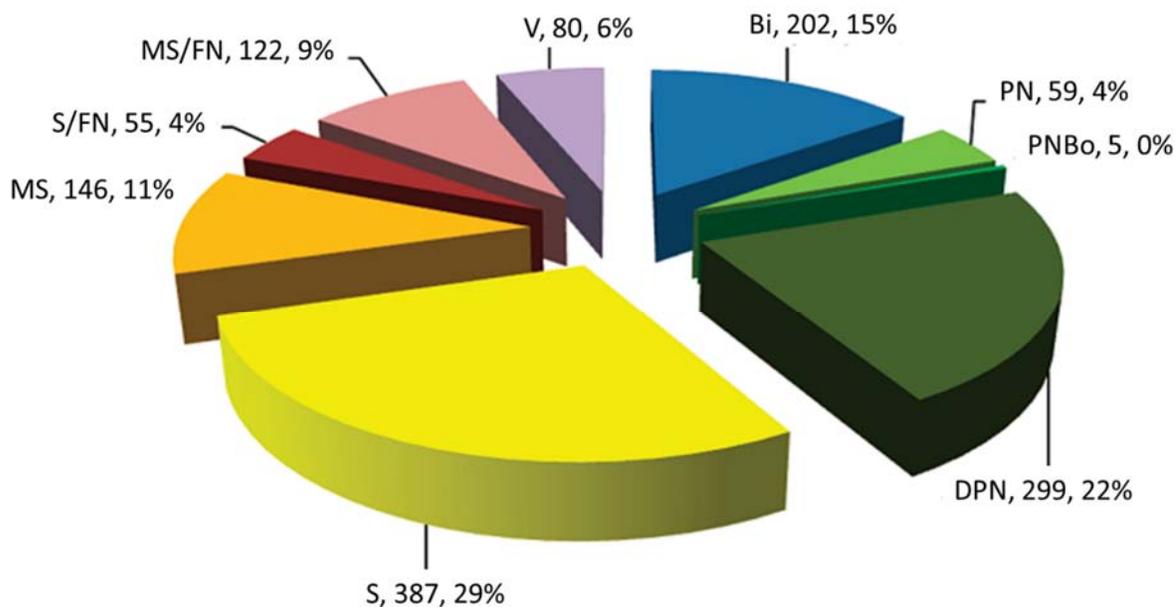
### 1.1. El uso de las plantas con fines terapéuticos

Las plantas han sido usadas con propósitos alimenticios y terapéuticos desde el inicio de la humanidad, y en los últimos siglos, el interés se ha enfocado en aquellas plantas que se emplean tradicionalmente con fines medicinales en búsqueda de las sustancias responsables de los efectos (Craig, 1999). Parte de los tratamientos empíricos han sido registrados y de esta manera se ha integrado un importante acervo del uso tradicional de las plantas para fines medicinales en todas las culturas del mundo (Cragg and Newman, 2013). A través de los años, las plantas han desempeñado un papel significativo en el mantenimiento de la salud humana. La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente el 80% de los habitantes de la tierra recurren a la medicina tradicional para los cuidados primarios de salud, por lo que la mayoría de estas terapias involucra el uso de extractos de plantas o de sus componentes activos (Craig, 1999; Tripathi et al., 2007). Tomando en consideración que solo un porcentaje relativamente bajo de las aproximadamente 500,000 especies de plantas superiores existentes han sido analizadas químicamente y el elevado número de medicamentos que se originan a partir de esta fuente, es evidente el importante papel de la flora como una fuente de nuevas sustancias farmacológicamente activas (Delgado, 1996).

El estudio de las plantas medicinales es uno de los métodos para examinar las interacciones y relaciones entre los componentes biológicos y culturales del ambiente (Bye, 1986). Se estima que aproximadamente 30,000 plantas superiores en el mundo han sido documentadas con uso etnomédico y alrededor de 150-200 agentes terapéuticos de origen natural han sido incorporados a la industria farmacéutica (McChesney et al., 2007). En México, de acuerdo al Instituto Nacional Indigenista (INI), existen aproximadamente 3,103 especies de plantas usadas en la medicina tradicional (Argueta and Cano, 1994) y la mayoría de ellas no han sido sujetas de análisis químico, toxicológico, farmacológico o clínico (Déciga-Campos et al., 2007). Actualmente, diversos estudios demuestran la importancia de los productos naturales en el hallazgo y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Butler, 2005; Newman and Cragg, 2012). Además, los productos naturales sirven como compuestos padres o materia prima para la síntesis y realización de derivados de los mismos (Newman and Cragg, 2012; Nielsen, 2002).

En la **figura 1** se ilustran el número y la fuente de agentes terapéuticos aprobados por la FDA y organizaciones similares, durante el período de 1981 a 2010. Los agentes terapéuticos obtenidos a

partir de fuentes naturales representan el 25%, los agentes terapéuticos que son derivados de productos naturales o en los cuales el farmacóforo es de origen natural representan el 35% y los agentes obtenidos completamente mediante síntesis química representan el 40%.



**Figura 1. Fuentes de obtención de agentes terapéuticos (1981-2010).** N= 1355 agentes terapéuticos. **PN:** Producto natural, **PNBo:** Producto natural botánico, **DPN:** Derivado de producto natural, presentan alguna modificación del producto natural mediante síntesis, **S:** Sintético, **MS:** Mimético sintético, agentes totalmente sintéticos que son inhibidores competitivos del sustrato natural, **S/FN:** Sintético/farmacóforo natural, **MS/FN:** Mimético sintético/farmacóforo natural, **V:** Vacuna, **Bi:** Biológico. Fuente: Adaptado de Newman and Cragg, 2012

Así, puede afirmarse que existe un interés renovado en la búsqueda continua de nuevos fármacos obtenidos a partir de fuentes naturales, ya sea de plantas, microorganismos, o animales (Koehn and Carter, 2005; Newman and Cragg, 2012).

### 1.2. *Ligusticum porteri* Coult & Rose

La clasificación taxonómica de la planta se presenta en la **tabla 1** (ITIS, 2015):

---

---

**Tabla 1. Taxonomía de *Ligusticum porteri***

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptofita
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Género	<i>Ligusticum</i>
Especie	<i>Ligusticum porteri</i>

---

*Ligusticum porteri* es comúnmente conocida como “chuchupate” “chuchupaste” en Chihuahua y Distrito Federal, “raíz de cochino” en Texas y Durango, “hierba de cochino” en Chihuahua y Durango, “oshá” en Colorado y Nuevo México, “raíz angélica” en Texas, “wasia” por los Rarámuris en Chihuahua, “ha-chi-di”, “ha-chi-de” por los Mescalero Apache en Nuevo México, “kwimi dechi” por los Zuni en Nuevo México, entre otros nombres (Linares and Bye, 1987), es una planta que crece en los bosques de pino y roble, al sur de Estados Unidos y al norte de la Sierra Madre Occidental, en México principalmente en Chihuahua. *L. porteri* es considerada uno de los más importantes remedios medicinales en la región (Appelt, 1985; León et al., 2011; Linares and Bye, 1987). La planta produce una raíz gruesa, vertical y presenta un olor muy característico (Linares and Bye, 1987) a apio y caramelo, presenta flores blancas que brotan del pedúnculo como un paraguas y al igual que la raíz tienen aroma a apio (Moore, 2003) (**Fig. 2**).



**Figura 2. Planta y raíces de *Ligusticum porteri* Coult & Rose**

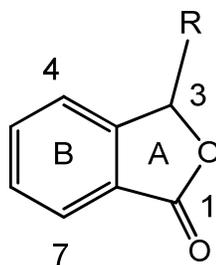
Se ha informado que las preparaciones de la planta son de uso interno y externo (Appelt, 1985). Se emplean las raíces secas y frescas de chuchupate para hacer diversas preparaciones, se hace un té que es empleado como tratamiento efectivo contra enfermedades gastrointestinales, dolores de cabeza y fiebre (Bye, 1986; Linares and Bye, 1987), así como para tratar diabetes, problemas de circulación, bronquitis, neumonía (Linares and Bye, 1987). Además se ha mencionado el uso del té hecho de las raíces para aliviar resfriados, infecciones y gases estomacales (Appelt, 1985). Los Rarámuris realizan la preparación de ungüentos y emplastos que aplican en las articulaciones para aliviar el dolor asociado a reumatismo (Bye, 1986). También se preparan tinturas a partir de la raíz fresca que se beben para eliminar infecciones bacterianas (Moore, 2003). Además se ha reportado que en Asia se han empleado especies de *Ligusticum* para el tratamiento de aterosclerosis, anemia (Beck and Chou, 2007) y accidentes cerebrovasculares (Beck and Chou, 2007; Zhu et al., 2010), entre otros muchos padecimientos. Las raíces de *Ligusticum chuanxiong* Hort han sido usadas en la medicina tradicional china, japonesa y coreana (Li et al., 2012) para tratar dolores de cabeza y se considera un remedio popular para tratar aterosclerosis, formación de trombos (Li et al., 2012), desórdenes menstruales, hinchazón (Ding et al., 2008), e isquemia (Li et al., 2012; Ran et al., 2011). En China se emplean las raíces de *Angelica sinensis* (Danggui), la cual también pertenece a la familia Umbelliferae, para tratar desórdenes ginecológicos y gastrointestinales (Lin et al., 2009).

---

Además del uso medicinal también se ha reportado el uso de las plantas, *Ligusticum porteri* y *Ligusticum chuanxiong* en preparaciones alimenticias, particularmente las semillas y hojas de la planta *L. porteri* se han empleado como condimento en la preparación de platillos a base de frijol o como aditivo alimenticio que ayuda a la digestión (Bye and Linares, 1986), o como condimento para platillos de carne y vegetales (Moore, 2003).

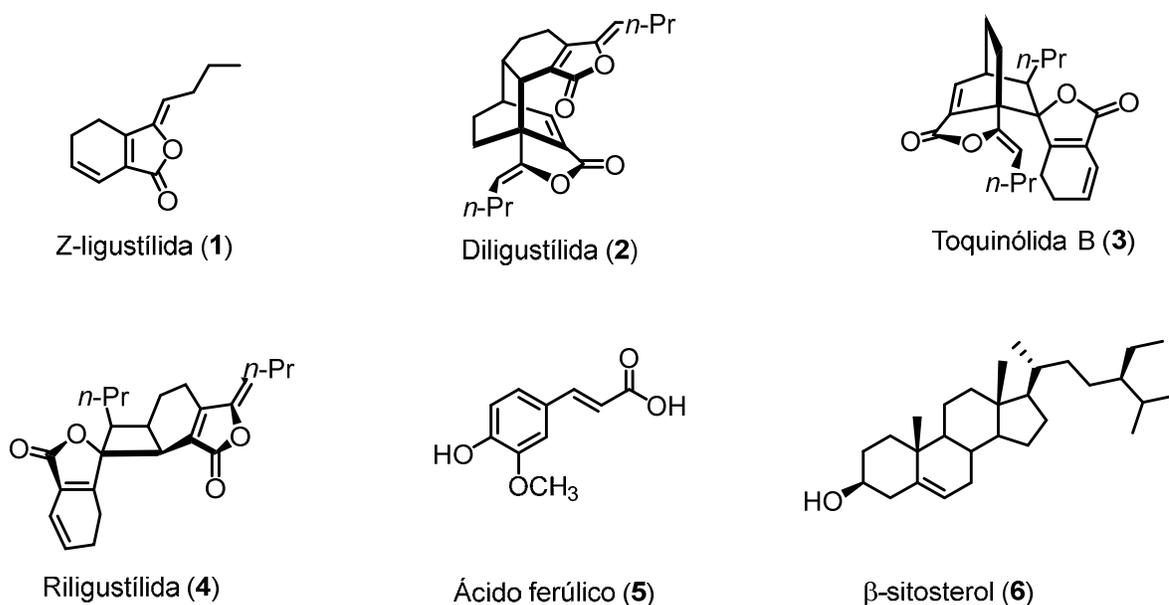
### 1.3. Ftálicas y otros constituyentes de *Ligusticum porteri* Coult & Rose

El análisis químico de *Ligusticum porteri* ha permitido el aislamiento de varios productos naturales entre los que se encuentran las ftálicas. Las ftálicas constituyen un reducido grupo de sustancias naturales que se aíslan de algunas especies de plantas de la familia Umbelliferae (Apiaceae) (Beck and Chou, 2007; Schinkovitz et al., 2008), principalmente de los géneros *Ligusticum*, *Levisticum* y *Angelica*, las cuales tienen uso en la medicina tradicional en Asia y América (Beck and Chou, 2007). Estructuralmente las ftálicas están formadas por un núcleo bicíclico, que fusiona una  $\gamma$ -lactona (anillo A) con un benceno (anillo B), a éste tipo de compuestos también se les conoce con el nombre de 3-*H*-isobenzofuran-1-onas (**Fig. 3**) (Karmakar et al., 2014).



**Figura. 3. Estructura y numeración de una ftálica.** Fuente: Karmakar et al., 2014

Las ftálicas aisladas de la planta son la *Z*-ligustílida (1), la *Z*-butilidenftálica, la diligustílida (2), la toquinólida (3) y la riligustílida (4), además se han aislado otros productos naturales como el ácido ferúlico (5), la isovainillina, el ferulato de coniferilo y el  $\beta$ -sitosterol (6) (León et al., 2011) (**Fig. 4**).



**Figura. 4. Algunos productos naturales aislados a partir de las raíces de *Ligusticum porteri*, (1-4 ftálidas)**

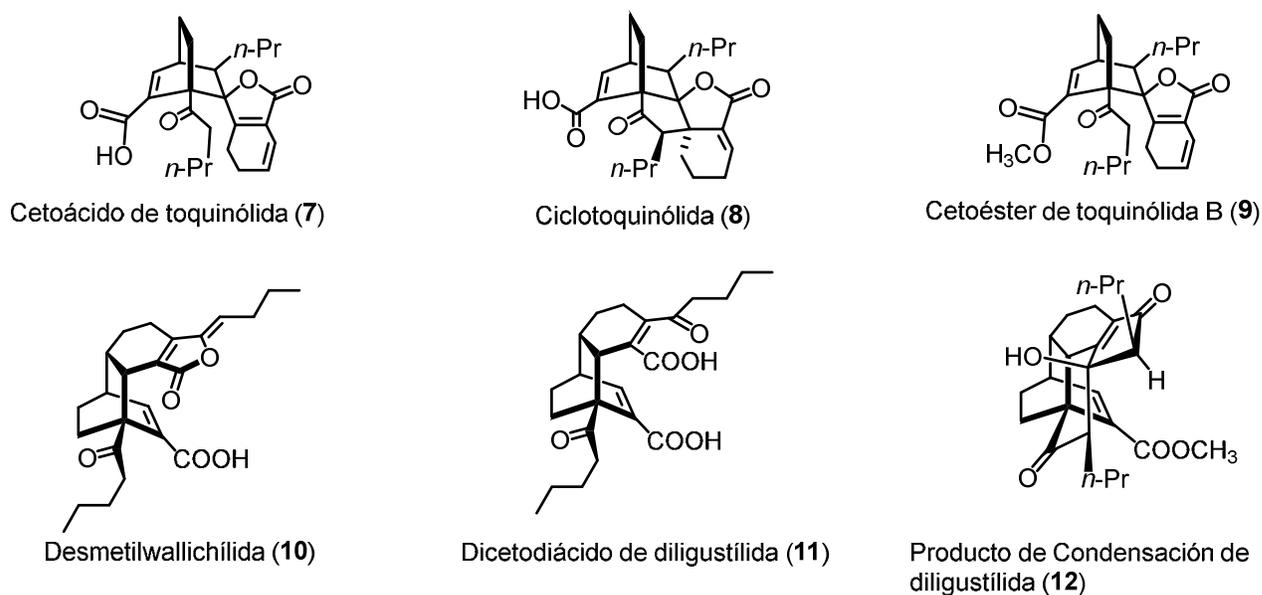
#### 1.4 Actividad biológica de ftálidas y otros constituyentes de *Ligusticum porteri* Coult & Rose

Algunos de los constituyentes de *L. porteri* han sido evaluados para probar su actividad biológica. La mayoría de las evaluaciones se refieren a la Z-ligustilida (1) y a la Z-butilidenftálida como los constituyentes responsables de la actividad. La Z-ligustilida (1) es el constituyente mayoritario de la planta y es una ftálida monomérica, la cual exhibe diversas actividades biológicas como lo son actividad antitrombótica, antiagregación plaquetaria, vasodilatadora (Li et al., 2012; Yan et al., 2008), posee actividad anticolinérgica (Beck and Chou, 2007), además de tener propiedades antiespasmódicas, antiinflamatorias, antiproliferativas contra células cancerosas (Fang et al., 2012), antimicrobiana, modulando la resistencia de una cepa de *Staphylococcus aureus* al antibiótico norfloxacin (Cégiéla-Carlio, 2005) y neuroprotectoras contra isquemia cerebral (Fang et al., 2012; Li et al., 2012), entre otras actividades informadas en la literatura. Algunas de las ftálidas dimericas también han sido evaluadas. La diligustilida (2), también denominada levistólida A, la toquinólida (3) (Del-Ángel et al., 2015; Huang et al., 2013) y la riligustilida (4) (Del-Ángel et al., 2015), mostraron tener actividad antiinflamatoria. De los constituyentes fenólicos, el ácido ferúlico (5) ha demostrado tener actividad antiinflamatoria y antioxidante (Li et al., 2004), además de actividad neuroprotectora contra isquemia cerebral (Cheng et al., 2010). La Z-butilidenftálida

---

tiene actividad acaricida, antihipertensiva, antioxidante (Beck and Chou, 2007), antiespasmódica (Fang et al., 2012) entre otras.

La reactividad química en el caso de las ftálicas también ha sido un tema de interés (Beck and Stermitz, 1995; Radcliff et al., 2008), algunas de las modificaciones a las estructuras han sido enfocadas hacia la obtención de compuestos con mejores efecto en las evaluaciones biológicas (Karmakar et al., 2014). La preparación de varias ftálicas semi-sintéticas a partir de las ftálicas diméricas diligustílida (**2**) y toquinólida (**3**) se ha realizado con anterioridad, con el fin de explorar su reactividad química, obteniéndose las siguientes ftálicas semi-sintéticas: cetoácido de toquinólida B (**7**), ciclotoquinólida B (**8**), cetoéster de toquinólida B (**9**), desmetilwallichílida (**10**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**) (**Fig. 5**) (Quiroz-García et al., 2003; Rios et al., 1998a).



**Figura 5. Derivados semi-sintéticos**

### 1.5. Inflamación

La inflamación es la respuesta que une a la inmunidad innata y a la adaptativa a los mediadores pro-inflamatorios como lo son: leucotrienos, histamina, bradiquinina, factores activadores de plaquetas, interleucinas y especies reactivas de oxígeno (Hawiger, 2001; Lo Faro et al., 2014). Esta respuesta se encarga de proteger al cuerpo contra infecciones y daño, pero también puede producir

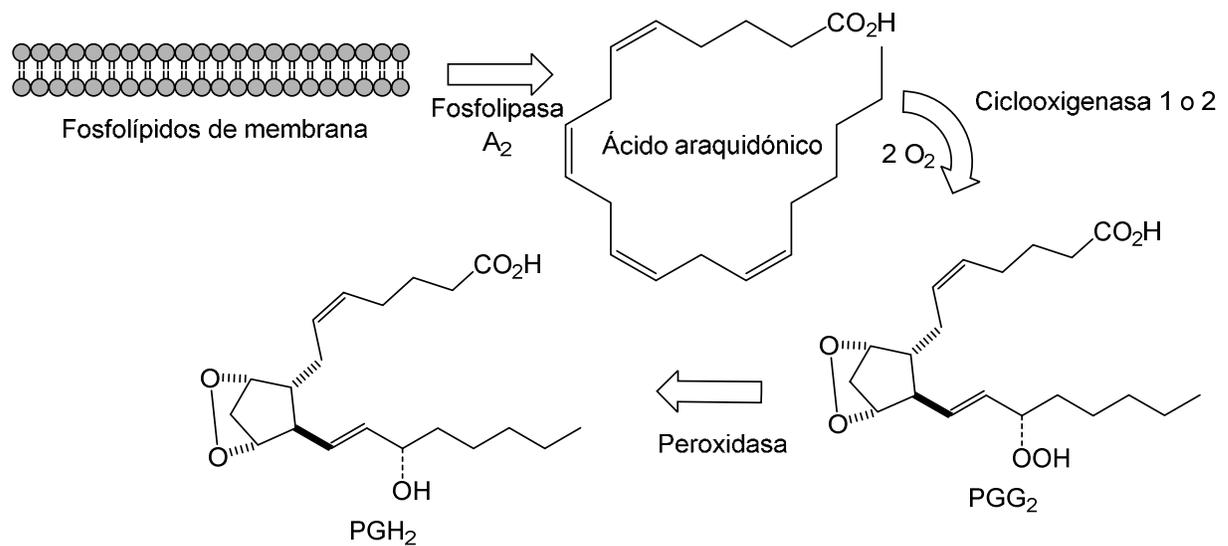
---

---

consecuencias dañinas al huésped (Gorzalczany et al., 2011; Hawiger, 2001). Las respuestas a estímulos inflamatorios son mediadas por fagocitos (leucocitos polimorfonucleares (LPMN), monocitos, macrófagos, células dendríticas) y linfocitos T (Hawiger, 2001). Las fases tempranas de respuesta a estímulos inflamatorios involucran la desgranulación de células mastocíticas (cebadas) acompañadas por la liberación de histamina y citocinas; las fases tardías involucran la migración de células inflamatorias. Las células mastocíticas secretan interleucinas y otras citocinas que regulan la duración e intensidad de la respuesta inmune al promover la expresión de moléculas de adhesión y mediante el reclutamiento celular.

La histamina es uno de los mediadores pro-inflamatorios, es sintetizada por el aparato de Golgi de las células mastocíticas y basófilos y es un vasodilatador y un potente estimulante de la permeabilidad vascular. La liberación de histamina puede ocurrir por estímulos inmunológicos (mediada por Ig-E) y no inmunológicos (asma inducido por ejercicio). Los leucotrienos son generados por la mayoría de las células que participan en las reacciones inflamatorias (células mastocíticas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos) y tienen los mismos efectos que la histamina. Los leucotrienos son derivados del ácido araquidónico y se originan de los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> o por acción secuencial de la fosfolipasa C y la lipasa de diacilglicerol. Las prostaglandinas son otro grupo de moléculas derivadas del ácido araquidónico y son el producto más abundante de las enzimas ciclooxigenasas (COX). Los efectos de las prostaglandinas generados en el tejido durante las reacciones dependientes de células mastocíticas son la permeabilidad vascular, sensación de prurito, dolor y agregación plaquetaria. La COX es una enzima asociada al retículo endoplásmico de las células mastocíticas (White, 1999). Existen dos isoformas de la COX, la COX-1 es la isoforma expresada constitutivamente, se expresa en plaquetas, riñón e intestino (Nantel et al., 1999), mientras que la COX-2 es la isoforma inducible mediante respuestas inflamatorias y también tiene función en el cerebro, riñón y sistema cardiaco. Las dos isoformas llevan reacciones secuenciales: la primera de dioxigenación del ácido araquidónico a prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y la segunda, la reducción de PGG<sub>2</sub> a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) (Blobaum and Marnett, 2007) (**Fig. 6**). Las cininas son hormonas peptídicas formadas en fluidos y tejidos durante la inflamación, son derivadas de las  $\alpha_2$  globulinas por corte proteolítico, la más importantes son las caliceínas del plasma y tejidos. En humanos se han encontrado tres tipos, la bradiquinina, la calidina (lys-bradiquinina) y la met-lys-bradiquinina; tienen efecto en la vasodilatación e incrementan el flujo sanguíneo capilar. El factor activador de plaquetas (FAP)

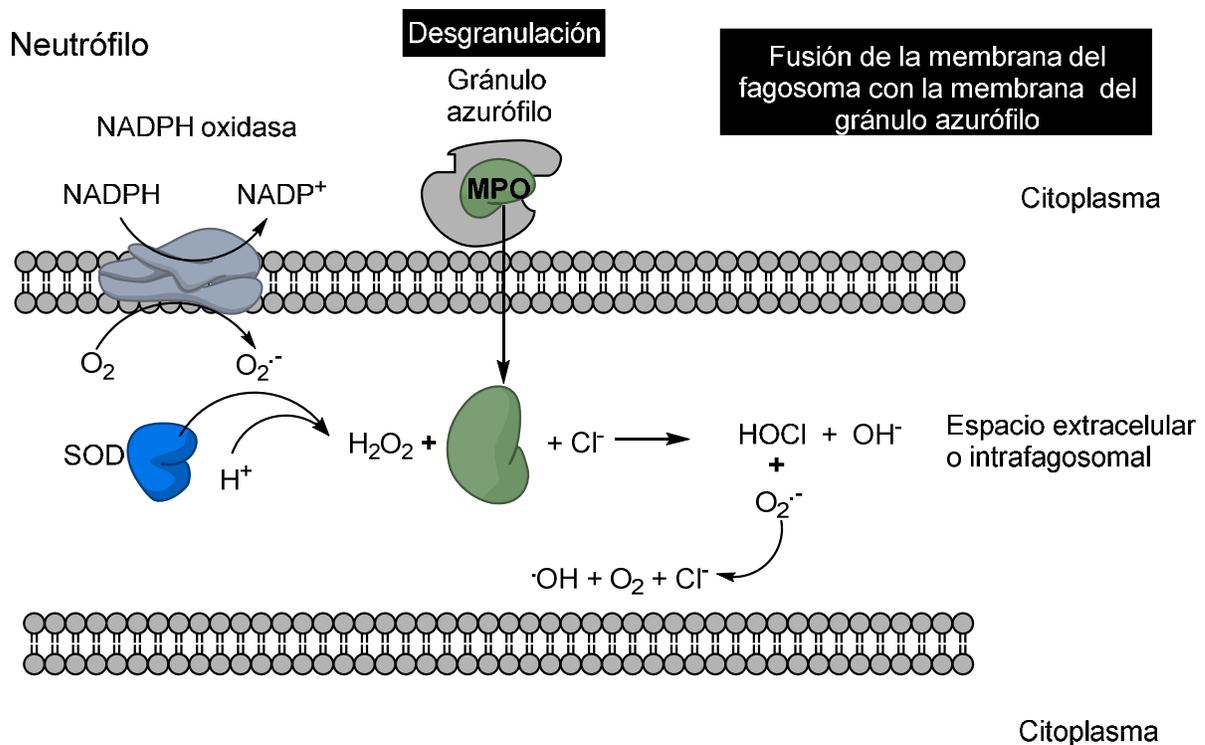
puede ser producido por las células mastocíticas, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, entre sus efectos se incluyen la activación de plaquetas y neutrófilos y la contracción del músculo liso. Las citocinas como las interleucinas (IL) IL-1, -2, -4, -5, -6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM) modulan la actividad antiinflamatoria de macrófagos, células T, células B y eosinófilos. Las quimiocinas son citocinas que tienen función de moléculas quimioatractantes para macrófagos y leucocitos en circulación, pero también pueden inducir la liberación de histamina de los basófilos y células mastocíticas y la activación de eosinófilos. Entre las quimiocinas se encuentran la IL-8 y la proteína inflamatoria de macrófagos  $1\alpha$  (White, 1999).



**Figura 6. Biosíntesis de las prostaglandinas G<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>**

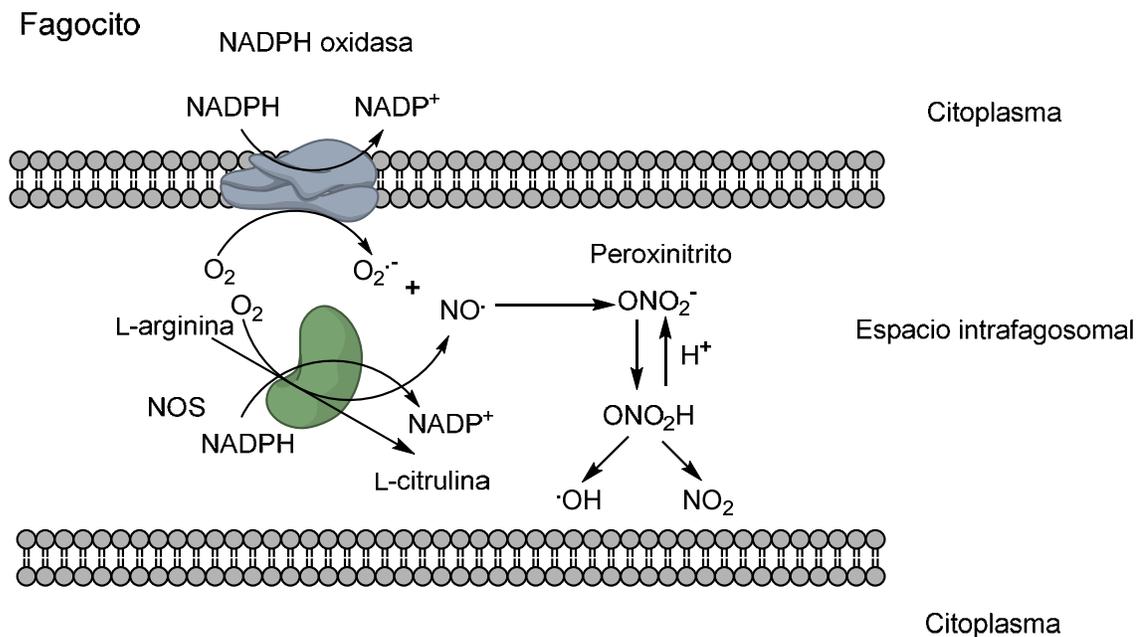
Los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) son las primeras células que responden al estímulo inflamatorio (Hawiger, 2001). Las células endoteliales se activan por citocinas pro-inflamatorias, expresan moléculas de adhesión y sintetizan quimiocinas y quimioatractantes, los cuales son necesarios para el reclutamiento de los leucocitos (Ley et al., 2007), a su vez los leucocitos responden al estímulo inflamatorio generando oxidantes y proteasas que en la mayoría de los casos contribuye a agravar el daño (Hawiger, 2001). Existen otras enzimas que también están involucradas en el proceso inflamatorio entre las que se encuentran la enzima mieloperoxidasa (MPO), la cual se encuentra principalmente en los neutrófilos y su evaluación

sirve como indicador del reclutamiento de estas células (De Young et al., 1989; Laight et al., 1994; Lo et al., 1982). La MPO se presenta en los neutrófilos en concentraciones no menores a 1-2%, en los gránulos azurófilos que se encuentran en el citoplasma, los monocitos también la contienen pero tienen menos gránulos azurófilos y los pierden cuando maduran a macrófagos. Cuando sucede la desgranulación en los neutrófilos, la membrana citoplasmática de los gránulos se fusiona con la del fagosoma y su contenido se vacía en el fagosoma (Klebanoff, 2005). La enzima MPO interacciona con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) obtenido como producto de la reacción del oxígeno molecular con la NADPH oxidasa, lo que se conoce como estallido respiratorio en las células fagocitarias. La enzima MPO, una hemoproteína, cataliza, en presencia de  $H_2O_2$ , la oxidación del  $Cl^-$  a ácido hipocloroso (HOCl). Aproximadamente el 45% de  $H_2O_2$  consumido se convierte a HOCl, la enzima puede también catalizar la oxidación de aniones bromuro a ácido hipobromoso. El HOCl puede formar cloruro ( $Cl^-$ ) en el fagosoma, cloro y dicloro aminas, así como también radicales hidroxilo al reaccionar con el anión radical superóxido (Prokopowicz et al., 2012) (**Fig. 7**).



**Figura. 7. Actividad de la enzima mieloperoxidasa**

El óxido nítrico (NO) está involucrado en diversos procesos biológicos, es conocido como factor relajante derivado del endotelio, regula el tono muscular y el flujo sanguíneo, es un neurotransmisor y también interviene en los procesos inflamatorios. Es producido enzimáticamente por la sintasa del óxido nítrico (SON) mediante la oxidación de L-arginina a L-citrulina, en una reacción que es dependiente del dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADPH) y oxígeno. Hay tres isoformas de SON la SONn, isoforma (III), es una enzima neuronal, la SONE, isoforma (I) o endotelial, ambas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina y la SONi, isoforma (II) o enzima inducible, la cual se expresa en procesos inflamatorios (Lo Faro et al., 2014). La producción de NO por la SONi se ha observado en macrófagos, neutrófilos, hepatocitos, células del músculo liso, células endoteliales (Guevara et al., 1998). El NO puede producir peroxinitrito ( $\text{ONO}_2^-$ ) al reaccionar con el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que a su vez puede oxidar grupos sulfhidrilo de moléculas enzimáticas o no enzimáticas. El  $\text{ONO}_2^-$  puede protonarse en medio ácido y producir ácido peroxinitroso ( $\text{ONO}_2\text{H}$ ), el cual se descompone y forma el radical hidroxilo (un oxidante fuerte) y nitrito (**Fig. 8**). Los fagocitos activados en un medio que contenga nitritos también pueden generar especies nitradas mediante la enzima MPO (Klebanoff, 2005). La xantina oxidasa (XO) es otra enzima que reduce nitratos y nitritos, el NO puede formarse mediante reducción de nitritos mediante la actividad de la XO (Lundberg and Weitzberg, 2010).



**Figura 8. Actividad de la enzima sintasa del óxido nítrico (SON)**

---

---

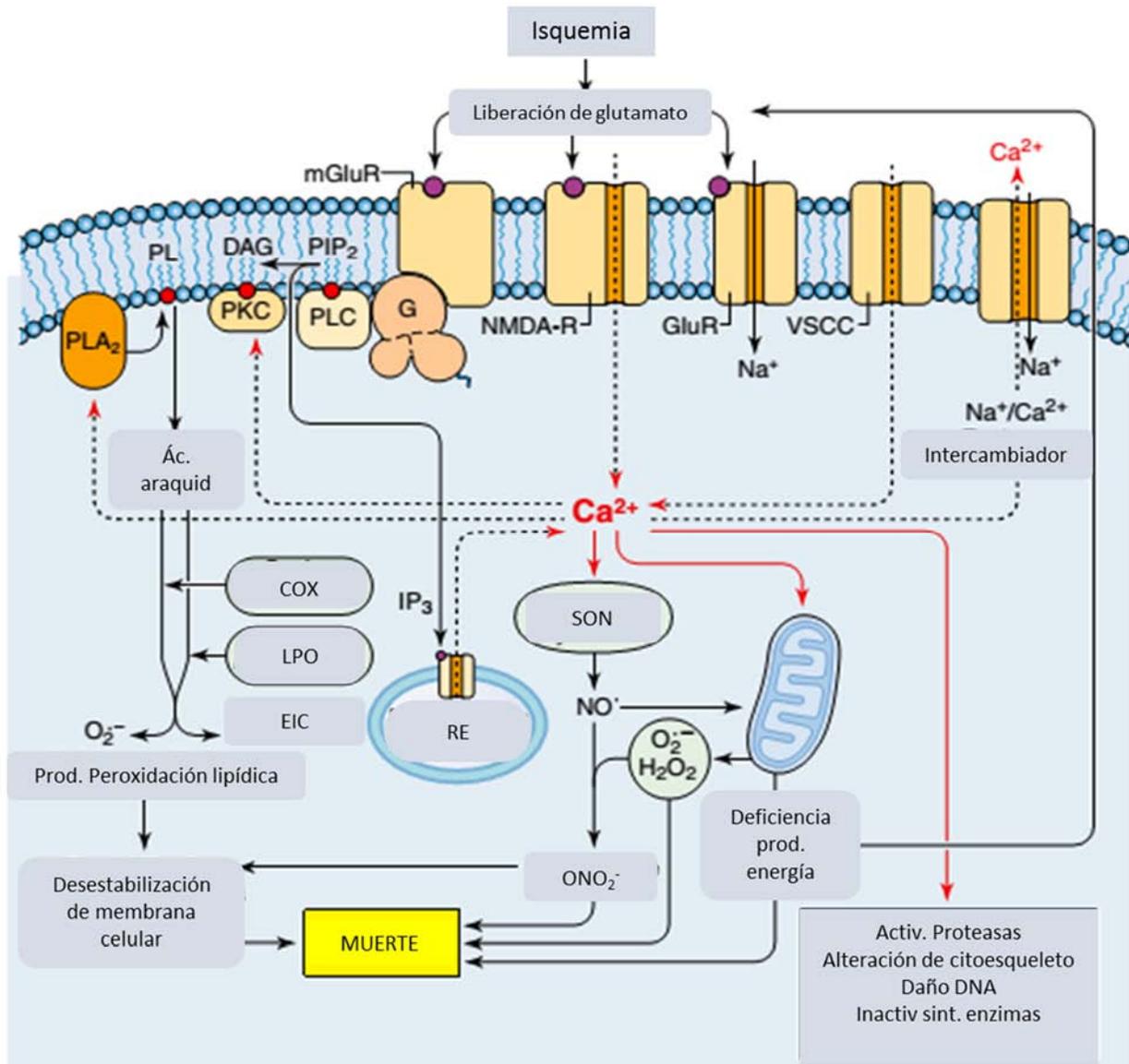
## **1.6. Accidentes cerebrovasculares**

Los accidentes cerebrovasculares son una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud en el 2012 ocuparon el segundo lugar representando 6.7 millones de muertes a nivel mundial (WHO, 2015). Más del 80% de los accidentes cerebrovasculares son resultado de isquemia cerebral y ocurren principalmente por oclusión de algún trombo, el resto de los accidentes cerebrovasculares son hemorrágicos y ocurren por ruptura de vasos sanguíneos (Lee et al., 1999). Aproximadamente 20% de los pacientes que presentan un accidente cerebrovascular isquémico no sobreviven el primer mes y menos del 30% de los que sobreviven se vuelven dependientes de otras personas (Peng et al., 2007).

### **1.6.1. Isquemia cerebral con reperfusión**

La isquemia cerebral ocurre cuando el flujo sanguíneo al cerebro es ausente o disminuye y el aporte de oxígeno y glucosa se ven afectados (Oliva et al., 2013). El flujo sanguíneo cerebral normal se mantiene alrededor de 0.5 a 0.6 ml/g/min (Mehta et al., 2007), las células con una perfusión sanguínea menor a 0.12 ml/g/min en el centro isquémico mueren en pocos minutos, mientras que aquellas células que rodean al centro isquémico, también llamada zona de penumbra, la cual se encuentra parcialmente perfundida, pueden sobrevivir por varias horas (Hossmann, 1994). Una vez que el tejido ha sobrepasado cierto límite de daño, la muerte celular se vuelve inevitable. En estados tempranos de la oclusión, en la zona de penumbra isquémica se puede comprometer de un tercio a la mitad del volumen de la lesión (Lo et al., 2003). La duración de la isquemia y la reperfusión juegan un papel prominente en la distribución del daño (Mehta et al., 2007), por lo tanto, la “reversibilidad” de la lesión está limitada por el tiempo (Hossmann, 2006). La progresión del infarto se puede dividir en tres fases, la fase aguda, en la cual el daño al tejido es consecuencia de la falla en la energía, esta fase se establece en los primeros minutos de la oclusión; la fase subaguda, donde el centro isquémico se expande a la zona de penumbra, esto ocurre después de 4-6 h, y por último, la fase de retraso, la cual puede durar varios días hasta semanas, aquí se presenta edema, inflamación y muerte celular (Hossmann, 2006).

Existen diversos mecanismos destructivos que se presentan durante la isquemia/reperfusión (**Fig. 9**).



**Figura. 9. Mecanismos que contribuyen al daño durante la isquemia/reperfusión en el cerebro.** DAG: diacilglicerol; G: proteína G; GluR: receptor de glutamato tipo AMPA/Kainato; IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trifosfato; mGluR: receptor metabotrópico de glutamato; NMDA-R: receptor de N-metil-D-aspartato; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PKC proteína cinasa C; PL: fosfolípidos; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>; PLC: fosfolipasa C; VSCC: canal de calcio sensible a voltaje; COX: ciclooxigenasa; LPO: lipooxigenasa; EIC: eicosanoides; SON: sintasa del óxido nítrico; ONO<sub>2</sub><sup>-</sup>: peroxinitrito; RE: retículo endoplásmico. Fuente: Adaptado de Siegel et al., 2006

---

Dentro de estos mecanismos se encuentran la pérdida de sustratos disponibles para formación de energía, esta pérdida resulta en la eliminación celular de ATP, se promueve un desbalance iónico debido a la disminución de la actividad de la ATPasa de sodio-potasio, a su vez este evento genera alteración en el potencial de la membrana plasmática, despolarizaciones peri-infarto causadas por las neuronas, y glia dan lugar a la liberación excesiva de glutamato y otros neurotransmisores con la consecutiva excitotoxicidad. Además se presenta la activación de receptores para glutamato (Hossmann, 1994; Iadecola and Anrather, 2011; Lo et al., 2003; Mehta et al., 2007). Conforme incrementan el número de despolarizaciones, también incrementa el tamaño del infarto (Mehta et al., 2007). Dichas despolarizaciones inician en el centro isquémico y se expanden hacia la zona de penumbra (Hossmann, 2006). La activación de los receptores ionotrópicos para glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), propionato de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y kainato promueven la permeabilidad de los iones de sodio, potasio y calcio y los receptores metabotrópicos causan la movilización del calcio de los almacenes internos (Mehta et al., 2007). La acumulación de calcio intracelular da lugar a disfunción mitocondrial, debido a una sobrecarga de calcio y a activación de enzimas dependientes del calcio (Hossmann, 2006; Iadecola and Anrather, 2011; Mehta et al., 2007; Qiao et al., 2009). Además, la liberación del calcio del retículo endoplásmico causa disfunción del organelo, anormalidades en el plegamiento de proteínas y en la síntesis de proteínas, así como expresión de proteínas de estrés. La sintasa del óxido nítrico es una enzima activada por calcio y su producto, el NO, contribuye a la excitotoxicidad causada por el glutamato (Hossmann, 2006).

En particular, la reperfusión es responsable de la generación de radicales libres. Durante el estrés oxidante la producción rápida de radicales supera la destoxificación de los mismos por diversas enzimas como son la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, y por antioxidantes no enzimáticos como vitamina E, C y glutatión (Mehta et al., 2007; Nakka et al., 2008). Las ERO causan peroxidación a las membranas plasmáticas y la reacción con el NO produce peroxinitrito, el cual es altamente reactivo. Además, los radicales libres causan la inducción de fallas mitocondriales, activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que produce la liberación de ácidos grasos tales como el ácido araquidónico (Hossmann, 2006), lo que desencadena una serie de reacciones inflamatorias. La inflamación induce una profunda respuesta inflamatoria local, involucrando varios tipos de células inmunes (Stoll et al., 2010).

---

Las respuestas inflamatorias en cerebros isquémicos con reperfusión, incluyen infiltración de monocitos y leucocitos, activación de la microglía y astrocitos, elevando la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias (IL-1, TGF- $\alpha$ , IL-10, FCT- $\beta$ ) (Stoll et al., 2010; Xia et al., 2010). En el caso de los dos últimos, se ha sugerido su actividad neuroprotectora (Xia et al., 2010). Existe evidencia de que la inflamación interviene en la progresión de la isquemia al causar daño neuronal. La microglía se activa durante la isquemia, en respuesta a que el estado del suplemento de oxígeno se encuentra comprometido (Or et al., 2011), sin embargo, la microglía también puede proveer protección contra el daño neuronal excitotóxico (Xia et al., 2010). Los astrocitos son las células más abundantes en el cerebro y existe evidencia que indica que juegan un papel crítico en el daño isquémico; los astrocitos activados, así como la microglía pueden producir citocinas que afectan significativamente la inflamación inducida por isquemia (Xia et al., 2010).

El edema también es un modulador de la isquemia y puede definirse como el incremento de agua en el tejido cerebral, se diferencia en dos fases: citotóxico y vasogénico. El primero se inicia por estimulación del metabolismo anaeróbico y causa hinchazón de las células, las despolarizaciones anóxicas están asociadas a la hinchazón de la célula y la recaptura intracelular de sodio está asociada al movimiento de agua, que es independiente del gradiente osmótico y se le conoce como “ósmosis anómala”. En ausencia de flujo sanguíneo, las células se hinchan a expensas del volumen del fluido extracelular, por lo que hay achicamiento de los compartimentos extracelulares, pero no hay un cambio en el contenido de agua. Si persiste el flujo residual de sangre, el agua se toma de la sangre. Después de la oclusión, el incremento de agua inicia en pocos minutos, se inician manifestaciones de necrosis, la barrera hematoencefálica se rompe y las proteínas de la sangre se liberan hacia el cerebro. Estos eventos inician el edema vasogénico, el cual es mayor a los 1-2 días después de la isquemia. Si el tejido infartado es grande, el incremento de volumen del tejido edematoso puede causar compresión del mesencéfalo y es considerada la complicación más peligrosa del infarto cerebral. Este tipo de edema es iso-osmótico y se acumula principalmente en el compartimento intracelular, lo que revierte el estrechamiento del espacio extracelular y da lugar a una “pseudonormalización” (Hossmann, 2006).

Las fallas mitocondriales causadas por los radicales libres también se presentan cuando la mitocondria está expuesta a concentraciones elevadas de calcio; este hecho hace que se vuelva poco selectiva hacia la permeabilidad de pequeñas moléculas causando desacoplamiento, e hinchazón. Este fenómeno se conoce como transición de la permeabilidad mitocondrial (TPm)

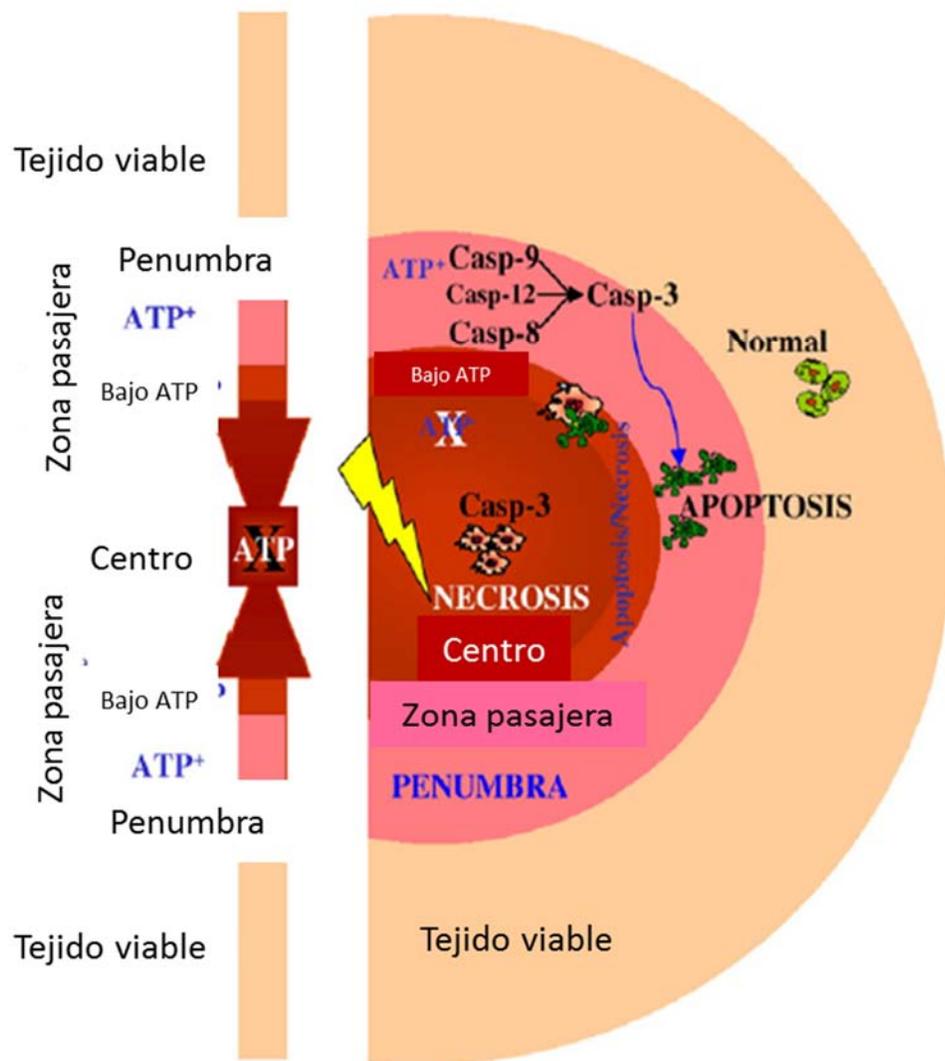
---

---

(Halestrap et al., 1998). La TPm se induce por la apertura de un poro no específico, el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). Se ha demostrado que este poro se encuentra presente cuando existe muerte celular apoptótica y necrótica y durante la isquemia con reperfusión. El PTPm permanece cerrado durante el período de isquemia y solamente abre en los primeros minutos de reperfusión. La apertura del poro causa entrada de agua y solutos, lo que ocasiona incremento del volumen de la mitocondria. La membrana mitocondrial interna puede sobrellevar el incremento, pero la membrana mitocondrial externa presenta rupturas y libera el contenido al citoplasma. Entre el contenido liberado se encuentran factores pro-apoptóticos como el citocromo *c* y el factor inductor de apoptosis (Hausenloy and Yellon, 2003), el citocromo *c* se localiza en la membrana mitocondrial interna y requiere de su previa disociación de la misma para ser liberado, no se ha determinado el mecanismo que causa su liberación, pero se han investigado varias vías además de la formación del PTPm, como la formación de canales causados por la inserción de Bax en la membrana mitocondrial externa, otra teoría es que existen cambios en la composición de fosfolípidos en la membrana mitocondrial, particularmente la cardiolipina, la cual se encuentra unida al citocromo *c* y al disminuir causa disociación del mismo (Borutaite et al., 2013), el factor inductor de apoptosis, es una proteína unida a la membrana mitocondrial interna, al iniciar la apoptosis, es liberada por una proteasa (Modjtahedi et al., 2006). Una apertura prolongada del PTPm causa eliminación rápida de ATP y resulta en muerte celular por necrosis y una apertura menos prolongada da lugar a muerte celular apoptótica. Este hecho explica la distribución de células necróticas en el centro isquémico y en la penumbra células apoptóticas (Hausenloy and Yellon, 2003) (**Fig. 10**). La necrosis está caracterizada por la pérdida de la integridad de la membrana, hinchazón previa a la lisis, liberación del contenido lisosomal al citoplasma y respuesta inflamatoria profunda. La apoptosis, por el contrario, involucra la preservación de la membrana celular y organelos, encogimiento de la célula, escisión de proteínas, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Loetscher et al., 2001; Miles and Knuckey, 1998). Como ya se mencionó anteriormente el nivel de ATP condiciona el tipo de muerte celular. En el centro isquémico, al no haber ATP ocurre muerte por necrosis, y al ocurrir la reperfusión los niveles de ATP se restauran, por lo que se provee de energía para iniciar la muerte por apoptosis (Hossmann, 2006; Miles and Knuckey, 1998). Las vías de señalización de la apoptosis pueden ser clasificadas en extrínseca e intrínseca y están mediadas por la activación de proteasas de la familia de las caspasas, las cuales normalmente son expresadas como pro-enzimas que son procesadas

---

proteolíticamente para ser activadas (Loetscher et al., 2001). La caspasa-3 cataliza el corte de proteínas que son esenciales para la estabilidad celular y es activada por las caspasas-8 y -9 iniciadoras. Las caspasas existen como monómeros e interactúan con otras proteínas por medio del dominio de activación y reclutamiento de caspasas y del dominio efector de muerte, los cuales permiten su activación. Así, las caspasas iniciadoras cortan formas inactivas de las caspasas efectoras, activándolas, y las caspasas efectoras activadas cortan otras proteínas contribuyendo al proceso apoptótico. En la vía extrínseca intervienen los receptores de muerte, todos los receptores de muerte contienen un dominio de muerte para reclutar proteínas apoptóticas. Así por ejemplo Fas (receptor de muerte) se une a su ligando (trímero), este a su vez interactúa con la pro-caspasa-8 y forman el complejo de señalización inductor de muerte, en el cual se activa la caspasa-8, la cual puede activar a caspasas efectoras como la caspasa-3. Además la caspasa-8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y activar la vía intrínseca (Nakka et al., 2008). La vía intrínseca o mitocondrial, está mediada por un evento inicial que activa la cascada de caspasas, este evento es la liberación del citocromo *c* de la mitocondria al citoplasma (después del estímulo de muerte la mitocondria se vuelve permeable); el citocromo *c* interacciona con Apaf-1 y la procaspasa-9 formando el apoptosoma, dando como resultado la auto-activación de la procaspasa-9 y la activación subsecuente de la procaspasa-3. Y una vez que la caspasa-3 es activada, se llega a un punto de no retorno y el bloqueo de la caspasa-3 no siempre previene la muerte celular (Loetscher et al., 2001). La muerte inducida por caspasas puede prevenirse por ciertas proteínas que han sido identificadas como proteínas inhibidoras de la apoptosis (Nakka et al., 2008), las proteínas miembros de la familia Bcl-2, como son Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (algunos homólogos pro-apoptóticos Bax, Bad), y la familia FLIP. En la zona de penumbra se han encontrado niveles elevados de la proteína Bax y disminución de Bcl-2 (Miles and Knuckey, 1998).



**Figura. 10. Tipos de muerte celular en el centro y penumbra isquémica.** Casp: caspasa.

Fuente: Adaptado de Mehta, S. L. et al., 2007

Las enfermedades cerebrovasculares son consideradas problemas de salud pública con alto impacto social, debido al alto costo derivado del tratamiento y la rehabilitación (Díaz-Ruiz et al., 2008). La trombólisis intravenosa, en particular, el activador tisular del plasminógeno (tPA), es el único tratamiento aprobado por la FDA (US Food and Drug Administration) para la isquemia cerebral (Lee et al., 1999). Sin embargo, cuando se administra después de 3 a 4.5 h de la oclusión se corre riesgo de hemorragia (Lo et al., 2003). Por lo tanto, es importante la búsqueda de agentes neuroprotectores que actúen sobre más de uno de los mecanismos de daño por

---

isquemia/reperfusión. La *Z*-ligustilida, el principal componente lipofílico de *L. porteri*, ha mostrado tener actividad neuroprotectora en modelos animales (Kuang et al., 2006; Peng et al., 2013; Peng et al., 2007). Se ha demostrado que dicho compuesto disminuye el volumen del infarto, atenúa la peroxidación lipídica y restaura la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa; también actúa inhibiendo la vía apoptótica actuando sobre la caspasa-3 (Kuang et al., 2006) y regula el factor de transcripción Nrf2, que interviene en el sistema de antioxidantes endógenos (Peng et al., 2013).



*Justificación*

---

---

## *2. Justificación*

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos a partir de fuentes naturales o de sus derivados sintéticos es un campo de investigación de relevancia en todo el mundo. En este caso se refiere a la búsqueda de agentes neuroprotectores y antiinflamatorios con mayor eficacia. Debido a la alta incidencia de accidentes cerebrovasculares en el mundo, lo que los sitúa como un problema de salud pública, se justifica la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que actúen como neuroprotectores y antiinflamatorios.

Pertinencia. Es importante conocer, preservar y aprovechar racionalmente la biodiversidad en búsqueda de nuevas sustancias que incidan en la resolución de problemas de salud pública.



*Hipótesis*

---

### 3. *Hipótesis*

Considerando que la sustancia natural *Z*-ligustilida (aislada a partir de *L. porteri*) presenta actividades antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica, antiapoptótica, entre otras, y dado que estos eventos se presentan en la isquemia cerebral focal, es plausible que las ftálicas diméricas naturales que se encuentran en el mismo vegetal (o sus derivados semi-sintéticos) puedan poseer actividades biológicas que aminoren el daño causado por isquemia en ratas. También es plausible que las ftálicas diméricas naturales que se encuentran en el mismo vegetal (o sus derivados semi-sintéticos) puedan poseer actividad antiinflamatoria.



## *Objetivos*

---

---

## 4. Objetivos

- Llevar a cabo la preparación de los extractos de acetona de *Ligusticum porteri* y la obtención de los productos naturales y semi-sintéticos.
- Evaluar el posible efecto de las ftálicas aisladas de *L. porteri*, y algunos derivados semi-sintéticos empleando el modelo del edema inducido con acetato de 12-O-tetradecanoilforbol en la oreja de ratón y el modelo del edema inducido con carragenina en la pata trasera de ratón.
- Realizar evaluaciones de los compuestos aislados de *Ligusticum porteri* y de los derivados semi-sintéticos en el modelo de isquemia/reperfusión en rebanadas de cuerpo estriado de rata, selección de compuestos con posible actividad neuroprotectora *in vitro*.
- Evaluar el posible efecto del dicetodiácido de diligustílida en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media con reperfusión *in vivo*. Evaluación de los déficits neurológicos y evaluación del área del infarto.
- Explorar algunos mecanismos de actividad biológica del dicetodiácido de diligustílida que operan sobre el daño causado por el modelo de oclusión de la arteria cerebral media con reperfusión. Evaluación de la actividad de las enzimas caspasa-3 y mieloperoxidasa.



*Estrategia experimental y  
métodos*

---

## 5. Estrategia experimental y métodos

### 5.1. Aislamiento de los productos naturales y derivados semi-sintéticos

Las raíces de la planta se obtuvieron en el mercado de Sonora de la ciudad de México. La identificación fue confirmada por Robert A. Bye y Edelmira Linares del Jardín Botánico, Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se realizó la maceración de las raíces secas pulverizadas de la planta *Ligusticum porteri* para obtener el extracto de acetona de manera convencional. Se adsorbió el extracto en celita proporción 1:1 y fue aplicado en 3 columnas empacadas con sílica. Se llevó a cabo la purificación y la separación de los constituyentes de la planta mediante métodos cromatográficos sucesivos. La cromatografía se llevó a cabo en columna abierta utilizando sílica gel malla 230-400, y las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck 60 F<sub>254</sub> 2 mm 20 x 20 cm. Los sistemas de elución empleados fueron mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo en polaridad creciente. Esta metodología se empleó para todos los compuestos, naturales y semi-sintéticos, a menos que se indique otro procedimiento específico. La separación de los compuestos fue rastreada por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de sílica gel Merck 60 F<sub>254</sub>, 0.20 mm de espesor, visualizando con lámpara de ultravioleta y con revelador de sulfato cérico de amonio, tomando como referencias estándares previamente aislados y caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos (Delgado et al., 1992). Los productos naturales obtenidos fueron: *Z*-ligustílida (**1**), diligustílida (**2**), toquinólida (**3**), riligustílida (**4**), ácido ferúlico (**5**) y  $\beta$ -sitosterol (**6**) y se obtuvieron los  $R_f$  correspondientes para cada una de los compuestos naturales y semi-sintéticos.

A partir de dos de los productos naturales se prepararon los derivados químicos por semi-síntesis. Del producto natural toquinólida (**3**) se obtuvieron el cetoácido de toquinólida B (**7**), ciclotoquinólida B (**8**) y cetoéster de toquinólida B (**9**). A partir del producto natural diligustílida (**2**) se obtuvieron la desmetilwallichílida (**10**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**). Para llevar a cabo las reacciones de semi-síntesis se emplearon disolventes de grado analítico. El THF fue secado con hidruro de calcio, manteniéndolo en agitación constante durante una noche y posteriormente destilándolo. El metanol (50-75 ml), fue purificado añadiéndole 3 g de virutas de magnesio y 0.5 g de yoduro de sodio; la mezcla se mantuvo en reflujo por 2 a 3 h y se destiló. Los disolventes fueron destilados previamente a cada reacción en la que se ocuparon.

---

---

### 5.1.1. Preparación de cetoácido de toquinólida B (7)

A una solución de toquinólida B (3) (150 mg en 15 ml de acetona), se le adicionó una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en agua (al 10%, 15 ml). La mezcla se mantuvo en agitación con ambiente de nitrógeno a reflujo por 73 min. La mezcla fue acidulada con HCl diluido (al 10%), pH 4 y extraída con acetato de etilo, 3 x 10 ml. La fase orgánica fue lavada con una solución saturada de NaCl, secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrada a presión reducida (Quiroz-García et al., 2003). El producto se purificó mediante cromatografía en placa preparativa, adsorbiendo el producto de reacción en una placa. Se eluyó con hexano-acetato de etilo 40:60. La franja correspondiente al compuesto, se delimitó y se raspó. El compuesto puro se extrajo de la sílica gel con lavados consecutivos de acetato de etilo (4 x 15 ml), los cuales fueron concentrados a presión reducida.

### 5.1.2. Preparación de ciclotoquinólida B (8)

A una solución de toquinólida B (3) (150 mg, en 10 ml de THF), se le adicionó NaOH sólido, (205.7 mg) y metanol (1 ml). La mezcla se mantuvo en agitación con ambiente de nitrógeno a reflujo por 2.5 h, la mezcla se concentró a presión reducida y se extrajo la fase orgánica con diclorometano. La fase orgánica fue lavada con una solución de HCl diluido (al 10%), a pH 4, y por una solución saturada de NaCl, 2 x 10 ml. Posteriormente la mezcla se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida (Quiroz-García et al., 2003). El concentrado fue purificado por cromatografía en placa preparativa como se describió por Quiroz-García.

Además, con el objetivo de mejorar el rendimiento, se realizó la semi-síntesis usando microondas como fuente de energía. El resultado fue que se logró abreviar el tiempo de reacción, realizando la reacción a 105 °C a 9.37 min de reacción, obteniéndose rendimientos similares al calentamiento convencional.

### 5.1.3. Preparación de cetoéster de toquinólida B (9)

A una solución de toquinólida B (3) (50 mg en 1.3 ml de metanol anhidro), se le adicionó una solución de sodio (33 mg en 1.6 ml de metanol). La mezcla se mantuvo en agitación con ambiente de nitrógeno a temperatura ambiente por 1 h. La mezcla fue acidulada con HCl (diluido al 10%), pH 4, el metanol fue evaporado a presión reducida y la fase orgánica fue extraída con acetato de etilo y lavada con una solución saturada de NaCl, 2 x 10 ml. Posteriormente la mezcla se secó con

---

---

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida (Quiroz-García et al., 2003). El concentrado fue purificado por cromatografía como se describió previamente por Quiroz-García.

Además se realizó la semi-síntesis usando microondas como fuente alterna de energía. Al llevar a cabo la reacción a 95 °C se logró realizar la reacción en 7.30 min, lo cual constituyó una reducción notable del tiempo de reacción con respecto al reflujo convencional.

#### **5.1.4. Preparación de desmetilwallichílida (10) y dicetodiácido de diligustílida (11)**

A una solución de diligustílida (2) (50 mg en 2.5 ml de acetona), se le adicionó una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (165 mg en 2.5 ml de agua). La mezcla se mantuvo en agitación con ambiente de nitrógeno a reflujo por 8 h. La mezcla fue acidulada con HCl (diluido al 10%), pH 4 y extraída con acetato de etilo, 3 x 10 ml. La fase orgánica fue lavada con una solución saturada de NaCl, secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrada a presión reducida (Rios et al., 1998b). El concentrado fue purificado adsorbiéndolo en sílica gel y aplicándolo en una columna empacada con sílica gel previamente suspendida en la mezcla de elución, hexano-acetato de etilo 60:40, adicionando unas gotas de ácido acético.

Además se realizó la semi-síntesis usando microondas como fuente alterna de energía buscando abreviar el tiempo de reacción. Se probaron dos condiciones, la primera usando 96 °C por 30 min de reacción y la segunda 106 °C por 40 minutos de reacción.

#### **5.1.5. Preparación de desmetilwallichílida (10)**

A una solución de diligustílida (2) (50 mg en 5 ml de diclorometano), se le adicionó dietil eterato de trifluoruro de boro (0.2 ml). La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por un período de 45 h. Transcurrido el tiempo de reacción se diluyó la mezcla de reacción con 5 ml de diclorometano y se lavó con una solución saturada de bicarbonato, 4 x 5 ml. Posteriormente se lavó con una solución saturada de NaCl, 3 x 5 ml. Finalmente el producto de reacción se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y fue concentrado a presión reducida (Quiroz-García, 2004). El concentrado fue purificado por cromatografía en columna como previamente se describió.

---

---

### 5.1.6. Preparación de producto de condensación de diligustílida (12)

A una solución de diligustílida (2) (50 mg, en 5 ml de THF), se le adicionó NaOH en escamas (12 mg) y metanol (0.02 ml). La mezcla se mantuvo en agitación con ambiente de nitrógeno a reflujo por 2 h. y es extraído con diclorometano (2 x 10 ml). La fase orgánica fue lavada con una solución de HCl (diluido al 10%), pH 4, y una solución saturada de bicarbonato, 2 x 10 ml, secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrada a presión reducida (Rios et al., 1998a). El concentrado fue purificado por cromatografía en columna como previamente se describió en la literatura.

La estructura de todos los compuestos, naturales y semisintéticos, fue confirmada mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, y por comparación con muestras auténticas aisladas previamente en el laboratorio.

## 5.2. Bioevaluaciones

Todas las evaluaciones reportadas en esta tesis se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### 5.2.1. Edema en oreja de ratón inducido con TDF

El edema en la oreja de ratón fue inducido de acuerdo a Rao et al. (1993) y Payá et al. (1996). Los experimentos se llevaron a cabo en ratones adultos macho de la cepa CD-1 de un peso entre 25 y 30 g. Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (i.p.) de pentobarbital de sodio (31.5 mg/kg, PiSA). La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 10 µl de una solución de acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TDF) en etanol (0.25 mg/ml, Sigma-Aldrich), solución inductora de edema. Después de 10 min la misma oreja recibió 1 µmol del compuesto natural o de la ftálica semi-sintética en 20 µl de vehículo (metanol). Los ratones fueron divididos en once grupos de cuatro ratones cada grupo, incluyendo: 1) TDF solo (control positivo), 2) *Z*-ligustílida (1) + TDF, 3) diligustílida (2) + TDF, 4) toquinólida B (3) + TDF, 5) riligustílida (4) + TDF, 6) cetoácido de toquinólida B (7) + TDF, 7) ciclotoquinólida B (8) + TDF, 8) cetoéster de toquinólida B (9) + TDF, 9) desmetilwallichílida (10) + TDF, 10) dicetodiácido de diligustílida (11) + TDF and 11) producto de condensación de diligustílida (12) + TDF. El ácido ferúlico (5) y β-sitosterol (6) no fueron evaluados en los modelos de inflamación. La oreja izquierda (control negativo) recibió solo 10 µL de etanol y 20 µL de metanol. Después de 4 h los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>, se removieron discos de 7 mm de diámetro de cada oreja y el

---

---

peso fue registrado. El incremento de peso entre los discos de la oreja derecha (tratada) e izquierda (control negativo) representa el edema. El porcentaje de inhibición del edema fue calculado con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-E) / C] 100$$

Donde:

C= Edema del grupo administrado solamente con TDF (control positivo) y E= Edema del grupo administrado con las ftálicas (Payá et al., 1996; Rao et al., 1993).

Las ftálicas que mostraron más de 50% de inhibición del edema en la oreja de ratón fueron seleccionadas para ser probadas a diferentes dosis. El rango de dosis empleadas fue 0.031, 0.1, 0.31, 0.56 y 1  $\mu\text{mol}$  en 20  $\mu\text{l}$  de metanol (vehículo). Se empleó indometacina (Sigma-Aldrich) como fármaco antiinflamatorio de referencia. Los grupos de tratamiento incluyeron 5 a 8 ratones, y se realizó el procedimiento previamente descrito. Además se calculó la dosis que provee el 50% de inhibición del edema ( $\text{DI}_{50}$ ).

Los compuestos que tuvieron una inhibición del edema superior al 50% en el modelo de TDF fueron probados en el modelo de edema de la pata trasera inducido con carragenina.

### **5.2.2. Edema en la pata trasera de ratón inducido con carragenina.**

El edema fue inducido por una inyección sub plantar de 0.05 ml de carragenina lambda estéril al 1% en la pata derecha de ratones CD-1. Grupos de 6 animales fueron usados para cada tratamiento: 1) carragenina (control positivo; Tipo IV Sigma-Aldrich), 2) cicloquinólida B (**8**) + carragenina, 3) dicetodiácido de diligustílida (**11**) + carragenina, 4) producto de condensación de diligustílida (**12**) + carragenina y 5) indometacina + carragenina. La indometacina fue usada como fármaco antiinflamatorio de referencia (7.5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)). Las ftálicas semi-sintéticas se administraron vía i.p. a una dosis de 50 mg/kg. La inflamación (edema) se determinó como el volumen desplazado por la pata usando un pletismómetro (7140 Ugo Basile) a diferentes tiempos, antes y después de la inyección de carragenina. El grado de inflamación fue definido como la diferencia en los volúmenes desplazados por la pata antes (tiempo 0) y después (tiempo 1, 3, y 6

---

---

h) de la administración de carragenina. El porcentaje de inhibición del edema fue calculado como sigue:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-E)/C] \times 100$$

Donde:

$C$ =edema determinado al tiempo= $t$  en el grupo administrado solamente con carragenina (control positivo) y  $E$ = edema determinado al tiempo= $t$  en los grupos que recibieron ftálida (Winter et al., 1962).

### 5.2.3. Actividad de la enzima mieloperoxidasa

Las muestras de las orejas (discos de 7 mm de diámetro) tratadas con TDF y que recibieron la administración de las ftálicas semi-sintéticas (ciclotoquinólida B (**8**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**)) a las dosis de 0.031, 0.1, 0.31, 0.56 y 1  $\mu\text{mol}$  fueron colectadas. Cada disco se colocó en un tubo con 1 ml de solución amortiguadora 80 mM de fosfato de sodio, pH 5.4, con 0.5 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Sigma-Aldrich), el cual se emplea para ayudar a extraer a la enzima. Las muestras fueron homogeneizadas por 30 s a 0°C en un homogeneizador (OMNI International, modelo 125). Los homogenados fueron congelados-descongelados tres veces y después fueron sonicados por 20 s. Enseguida se centrifugan los tubos a 12000 g a 4 °C por 10 min. El ensayo de la actividad de la enzima mieloperoxidasa se llevó a cabo en placa, cada muestra por cuadruplicado (10  $\mu\text{l}$ ). Se le adicionó solución amortiguadora de fosfato de sodio (180  $\mu\text{l}$ , 80 mM), pH 5.4 y se mantuvo a 37 °C. Se le adicionó a cada pozo peróxido de hidrógeno (20  $\mu\text{l}$ , 0.017 %). La reacción se inició con la adición de tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich) (20  $\mu\text{l}$ , 18.4  $\mu\text{M}$ ), en una solución acuosa de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) (50 %). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 5 min con agitación ligera. La reacción fue detenida con la adición de ácido sulfúrico (20  $\mu\text{l}$ , 2 M). La tetrametilbenzidina es un cromógeno, y actúa como donador de hidrógeno para la reducción del peróxido de hidrógeno, el producto de la reacción después de añadir el ácido sulfúrico es de color amarillo. La actividad enzimática se determinó con espectrofotómetro (Syner/HT Biotek Instruments), por la medición de la densidad óptica (DO) a 450 nm. La actividad se expresó como la DO/biopsia (Bradley et al., 1982; Recio et al., 2000; Suzuki et al., 1983).

---

#### **5.2.4. Análisis histológico del tejido de la oreja.**

Las secciones de las orejas tratadas con TDF, con indometacina y con las ftálicas semi-sintéticas ciclotoquinólida B (**8**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**), fueron fijadas en una solución de 10% de formaldehído. Las secciones fueron embebidas en parafina, seccionadas y teñidas con hematoxilina-eosina. La infiltración de leucocitos y el grosor de la oreja fueron evaluados en áreas representativas seleccionadas con los objetivos de 10 x y 40 x. La cuantificación de los leucocitos se llevó a cabo por su conteo por campo. Se analizaron cuatro campos de tres distintas secciones histológicas de cada grupo.

#### **5.2.5. Análisis de la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 *in vitro*.**

Las ftálicas semi-sintéticas ciclotoquinólida B (**8**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**) fueron probados en un ensayo inmunoenzimático con enzima pura (Cayman Chemical Company, USA) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. El ensayo mide directamente la concentración de  $PGF_{2\alpha}$ , la cual se obtiene de la  $PGH_2$  producida por la COX y es reducida con cloruro de estaño (II). El ensayo inmunoenzimático se basó en la competencia entre la cantidad producida de PG y el conjugado de PG-acetilcolinesterasa (que se mantiene constante), por el antisuero de PG. La cantidad de conjugado que se unió al antisuero es inversamente proporcional a la concentración de PG producida. El complejo antisuero-PG se une al anticuerpo anti-conejo y se adiciona el reactivo de Ellman, el cual contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa y ácido de 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico) que al reaccionar producen ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, un producto amarillo que absorbe a 412 nm. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de conjugado unida e inversamente proporcional a la cantidad de PG libre. Las ftálicas semi-sintéticas fueron evaluadas a 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M y se evaluó la actividad de las enzimas COX-1 y -2. Se emplearon 30  $\mu$ M de indometacina (Sigma-Aldrich) o celecoxib (inhibidor selectivo de la COX-2), como fármacos antiinflamatorios de referencia. (Chandna et al., 2013; Gautam et al., 2010).

---

## **5.2.6. Evaluación de nitritos *in vitro***

### **5.2.6.1. Cultivo celular**

Células RAW 264.7 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71). Las células fueron cultivadas en medio esencial modificado Dulbecco (MEMD) con L-glutamina a 4 mM, glucosa a 4.5 g/l, piruvato de sodio (1mM) suplementado con suero fetal bovino inactivado con calor (ATCC 30-2002) al 10 %. Las células se mantuvieron a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) y fueron usadas entre los pasajes 5 y 18. Las células se suspendieron en medio MEMD y la viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano. Las ftálicas cicloquinólida B (**8**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**) fueron disueltos en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y las concentraciones empleadas fueron de 100, 31, 10 y 3.1 µM. La concentración final en el sobrenadante del cultivo celular fue ≤ 0.1 %, la cual no tiene efecto en el experimento.

### **5.2.6.2. Concentración de nitritos**

Para el experimento 100 µl/pozo de 1 X 10<sup>6</sup> células/ml fueron cultivadas en una placa de 96 pozos e incubados por 2 h para favorecer la adherencia. Las células se trataron por 24 h a 37 °C con o sin lipopolisacárido (LPS) (*E. coli*, Serotipo 055 B5, Sigma), 1 µg/ml y a los pozos respectivos además se añadieron 50 µl de cada ftálica de prueba a las concentraciones de 3.1 a 100 µM. El hidrocloreuro de aminoguanidina (Sigma) fue usado como compuesto de referencia. La concentración de nitritos en el medio fue medida y usada como un indicador del óxido nítrico de acuerdo a la reacción de Griess (Green et al., 1982). Se utilizó el sobrenadante, 100 µl de cada medio fue mezclado con el mismo volumen de reactivo de Griess el cual contiene, 1 % de sulfanilamida en 5 % de ácido fosfórico y 0.1 % de dihidrocloreuro de N-(naftil)-etilendiamina en agua. La sulfanilamida reacciona con los nitritos en medio ácido para formar un compuesto de diazonio, el que interacciona con las aminas aromáticas del dihidrocloreuro de N-(naftil)-etilendiamina formando un producto de color rosado. Las absorbancias de las muestras se determinaron a 515 nm con un lector de ELISA (Syner/HT Biotek Instruments). La concentración de nitritos (µM) fue determinada usando una curva estándar de NaNO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron tres veces en triplicado.

---

### 5.2.6.3. Viabilidad celular

Se emplearon las mismas células que se cultivaron para la evaluación de nitritos, 100 µl/pozo de 1 X 10<sup>6</sup> células/ml, las ftálidas en evaluación se mantuvieron en contacto con las células por un período de 24 h, las células fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos antes de la realización de la evaluación de viabilidad. La respiración celular fue usada como un indicador de viabilidad celular y fue determinada por la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a formazán. Esta reducción es dependiente de la mitocondria (Mosmann, 1983). Se añadieron 10 µl de MTT a cada pozo de la placa y se incubaron por 4 h a 37°C. El colorante incorporado se disolvió en 100 µl de DMSO. Se determinaron las absorbancias a 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de MTT incorporado en las células tratadas, comparadas contra las células del grupo control.

### 5.2.7. Actividad neuroprotectora *in vitro*

Algunos de los constituyentes de *L. porteri* entre los que se incluyen: *Z*-ligustílida (**1**), diligustílida (**2**), toquinólida (**3**), riligustílida (**4**), ácido ferúlico (**5**) y β-sitosterol (**6**), y además de los derivados semi-sintéticos: cetoácido de toquinólida B (**7**), ciclotoquinólida B (**8**), cetoéster de toquinólida B (**9**), desmetilwallichílida (**10**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**) fueron evaluados para determinar si mostraban actividad neuroprotectora *in vitro*. Para lo cual, se emplearon rebanadas de cuerpo estriado de rata sometidas a condiciones de isquemia y reperfusión y como marcador de daño celular se cuantificó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

#### 5.2.7.1. Disección e inducción de isquemia/reperfusión en rebanadas estriatales

Se emplearon ratas Wistar (ocho por grupo) de un peso entre 250-300 g; se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio, con acceso de agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron aclimatados al menos una semana antes de los experimentos. Los animales fueron decapitados y los cerebros fueron removidos rápidamente, el cuerpo estriado fue disectado en hielo y grupos al azar de cuatro rebanadas con 0.5 mm de espesor fueron seccionadas a mano. Las rebanadas se mantuvieron a 37 °C en 2 ml de medio Krebs fisiológico, constituido como sigue: NaCl 118 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.17 mM, glucosa 5.6 mM, Tris-pH 7.7 25 mM, bajo flujo continuo de O<sub>2</sub> 95 % y CO<sub>2</sub> 5 %. Las rebanadas fueron distribuidas en cuatro

---

grupos: a) grupo normóxico + vehículo, b) grupo isquémico/reperfusión + vehículo, c) grupo normóxico + compuesto, d) grupo isquémico/reperfusión + compuesto. En esta evaluación se utilizó el término isquemia para las condiciones donde existe ausencia de oxígeno y glucosa en el medio de las rebanadas estriatales. El procedimiento se llevó a cabo como sigue: después de un período de equilibrio o recuperación de 10 min, el medio fue removido y remplazado por medio fresco. En seguida, las rebanadas fueron incubadas en cada condición por 20 min más. Se consideró como condición de normoxia si el medio estaba suplementado con glucosa y gasificado con O<sub>2</sub> 95 % y CO<sub>2</sub> 5 %, la condición isquémica se indujo cuando el medio se encontraba sin glucosa y oxígeno y gasificado con N<sub>2</sub> 95 % y CO<sub>2</sub> 5 %. Los compuestos evaluados se adicionaron al medio durante este periodo de tiempo. Las concentraciones de los compuestos evaluados fueron las siguientes: Z-ligustílida (**1**) 0.0526 mmol, diligustílida (**2**) 0.0263 mmol, toquinólida (**3**) 0.0263 mmol, riligustílida (**4**) 0.0263 mmol, ácido ferúlico (**5**) 0.0514 mmol, β-sitosterol (**6**) 0.0241 mmol, cetoácido de toquinólida B (**7**) 0.0251 mmol, ciclotoquinólida B (**8**) 0.0251 mmol, cetoéster de toquinólida B (**9**) 0.0241 mmol, desmetilwallichílida (**10**) 0.0251 mmol, dicetodiácido de diligustílida (**11**) 0.0240 mmol y el producto de condensación de diligustílida (**12**) 0.0242 mmol. Las concentraciones de los compuestos fueron establecidas de acuerdo a un estudio en el cual el monómero Z-ligustílida fue administrado vía intranasal y se recuperó en el cerebro en concentraciones de ng/ml, la concentración fue convertida a concentración molar (Guo et al., 2009), con respecto al resto de los compuestos, la concentración se estableció en relación a su peso molecular. Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO 1 % (Sigma)/solución salina/propilenglicol. Al término del periodo isquémico, el medio fue removido de nuevo y descartado. El medio fue reemplazado de nuevo con medio fresco en condiciones de normoxia y las rebanadas fueron expuestas a un período de reperfusión por 30 min, en seguida el medio fue colectado (De La Cruz et al., 2002; Virgili et al., 1995).

Además tres compuestos semi-sintéticos fueron evaluados a dos concentraciones adicionales: para ciclotoquinólida B (**8**), 0.100 y 0.150 mmol, para desmetilwallichílida (**10**), 0.100 y 0.150 mmol y para dicetodiácido de diligustílida (**11**), 0.0961 y 0.144 mmol.

#### **5.2.7.2. Evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa**

El medio Krebs fisiológico empleado durante el periodo de reperfusión fue colectado y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa fue evaluada en 100 µl de muestra con 1 ml de mezcla:

---

solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7 (Baker), piruvato de sodio (Sigma) y dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) (Sigma). Los cambios en la absorbancia se registraron a 340 nm registrando la oxidación del NADH en presencia de piruvato (Sigma) en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis). La actividad de LDH fue calculada de acuerdo a los promedios de los  $\Delta A$  registrados del tiempo 0 a 4 min y se corrigieron con la concentración de proteínas determinada en las rebanadas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

### **5.2.8. Actividad neuroprotectora *in vivo***

Se evaluó la posible actividad neuroprotectora *in vivo* de la ftálica semi-sintética dicetoácido de diligustílida (**11**). Se empleó el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) (Longa et al., 1989) en rata.

#### **5.2.8.1. Modelo de oclusión de la arteria cerebral media y tratamiento.**

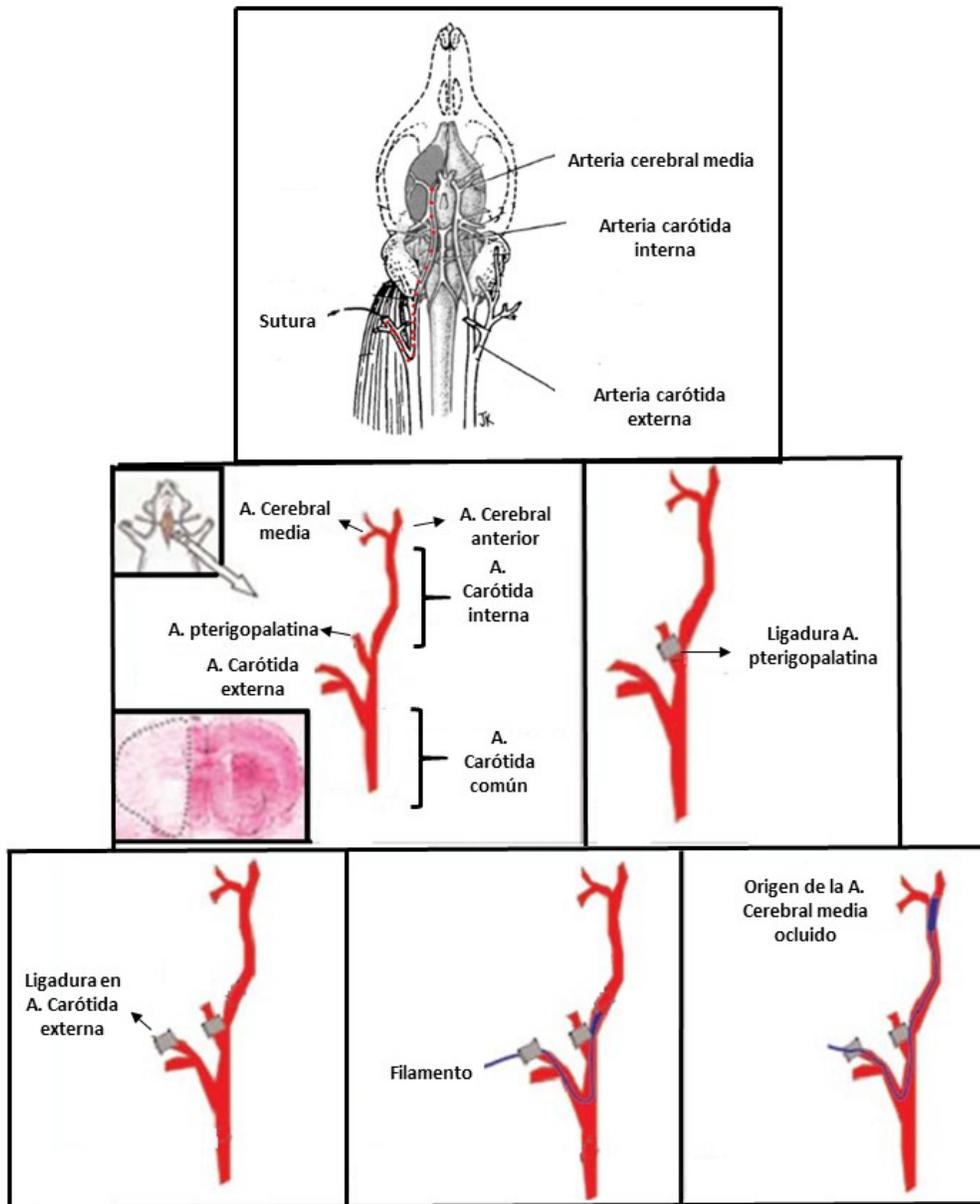
Se emplearon ratas Wistar (siete por grupo) de entre un peso de 280-300 g, las cuales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio con acceso de agua y comida *ad libitum*. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos como sigue: 1) Operación simulada + vehículo, 2) 2 h de isquemia/reperfusión + vehículo, 3) 2 h de isquemia/reperfusión + compuesto. 4) Operación simulada + compuesto. El compuesto evaluado fue la ftálica semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (**11**) y se administró 5 minutos antes de iniciar el período de reperfusión. La dosis empleada fue de 20 mg/kg de peso corporal del animal, administrada por vía i.p. en forma de suspensión empleando una solución al 3 % de solución salina y polietilenglicol (Sigma). Esta dosis fue elegida de acuerdo a la información de la literatura en la cual se empleó el compuesto Z-ligustílida (**1**), dicho compuesto se ha utilizado en el mismo modelo (Kuang et al., 2006).

Los animales fueron anestesiados con 2 % de isofluorano usando una mascarilla. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C en una plataforma térmica durante la cirugía y hasta que se recuperaron de la anestesia. Se realizó una incisión en la piel sobre la parte media de la región cervical ventral. Se expusieron la arteria carótida común izquierda, la arteria carótida interna izquierda y la arteria carótida externa izquierda. La porción distal de la arteria carótida externa izquierda se ligó y se cortó. Se introdujo una sutura de nylon (3-0) en el lumen de la arteria carótida externa izquierda en

---

---

dirección hacia la arteria carótida interna. La sutura se avanzó por 17 mm dentro de la arteria carótida interna izquierda y se dejó ahí. Finalmente, la incisión se cerró y los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas por 2 h. Transcurrido este tiempo se inició la reperfusión por apertura de la herida, mediante el retiro del filamento, el cual se extrajo completamente (**Fig. 11**). Después de la reperfusión se evaluaron los déficits neurológicos de los animales usando la escala descrita por Longa et al. (1989). Esta escala considera la presencia de signos neurológicos en las ratas como sigue: 0 = déficit no observable, 1 = flexión de las patas delanteras, 2 = circulación unidireccional, 3 = caída hacia el lado contra lateral, 4 = disminución del nivel o falta de conciencia, 5 = muerte después de la cirugía. Solo aquellos animales que mostraron un valor  $>2$  después de recuperarse de la anestesia fueron incluidos en el estudio.



**Figura 11. Esquema del modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM).** Fuente: Adaptado de Longa et al., 1989; Prieto-Arribas et al., 2008

### 5.2.8.2. Evaluación de los déficits neurológicos

Los déficits neurológicos se evaluaron a las 24, 48 y 72 h, usando la escala descrita por Longa et al. (1989). Al término de este periodo los animales que sobrevivieron fueron sacrificados por decapitación, después se realizó el tratamiento respectivo del tejido para ser empleado en las diversas evaluaciones.

---

---

### **5.2.8.3. Análisis histológico, determinación del área de la lesión**

Tres días después de la isquemia/reperfusión los animales fueron anestesiados con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (PiSA), en seguida se administró 1 ml de heparina y fueron perfundidos transcárdialmente con formol al 10%. Los cerebros fueron removidos inmediatamente después de la perfusión y fueron fijados para su examinación histológica, posteriormente se deshidrataron y embebieron en parafina. Secciones coronales de 10  $\mu\text{m}$  de espesor fueron obtenidas cada 1 mm, se usó una matriz para cerebro adulto de rata, de acero inoxidable. Secciones de corteza (coordenadas: interaural 14.64 mm, bregma 5.64 mm), estriado (coordenadas: interaural 8.64 mm, bregma -0.36 mm) e hipocampo (coordenadas: interaural 5.52 mm, bregma -3.48 mm) fueron evaluadas usando el atlas del cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1998). Después de la tinción con hematoxilina-eosina las secciones fueron evaluadas para determinar el área de la lesión utilizando la medición del área (Niyaz et al., 2007). Las muestras fueron digitalizadas usando una computadora equipada con el programa IM 1000 y una cámara digital 300 FX. El análisis patológico se realizó con una base de datos Image V.4.01 (Leica) y una cámara CCD-IRIS Sony. Los resultados fueron expresados como porcentaje del área isquémica de la región evaluada.

### **5.2.8.4. Actividad de la enzima mieloperoxidasa**

La actividad de la enzima mieloperoxidasa fue medida de acuerdo a Bradley et al. (1982) con ligeras modificaciones. Las regiones de corteza, estriado e hipocampo fueron homogeneizadas en 20 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6. Después de homogeneizar las muestras fueron centrifugadas a 30,000 g por 30 min a 4 °C (Sorvall OTD55B Ultracentrífuga). Las pastillas fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos y centrifugadas como se describió anteriormente. Las pastillas se resuspendieron en una solución de 0.5 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6. Las muestras se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación, en seguida se sonicaron por 30 s (ultrasonic processor Daigger GEX130 PD). Después de 20 min de incubación a 4 °C, las muestras fueron centrifugadas de nuevo a 12,000 g por 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue colectado para evaluar la actividad de la enzima mieloperoxidasa. La reacción fue evaluada espectrofotométricamente: 9  $\mu\text{l}$  de la muestra se mezclaron con 261  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM que contenía 0.167 mg/ml de dihidrocloruro de *o*-dianisidina (Sigma) y peróxido de hidrógeno 0.0005 %. El fundamento de la técnica es el mismo que en la técnica de

---

---

cuantificación previamente descrita, solamente se cambió el sustrato cromógeno de la MPO. Los cambios en la absorbancia se registraron en un lector de placas (EON Biotek UV-Vis) a 460 nm en periodos de 30 s durante 3 min (Bradley et al., 1982). Las unidades de mieloperoxidasa se determinaron como sigue:

$$U/\mu l = \Delta A \times V/t \times \epsilon \times d \times v$$

Donde:

$\Delta A$ = promedio de los cambios en la absorbancia,  $V$ = volumen final ( $\mu l$ ),  $t$ = tiempo (minutos),  $\epsilon$ = coeficiente de absorción molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ),  $d$ = paso de la luz y  $v$ = volumen de la muestra ( $\mu l$ ) (Fietz et al., 2008; Graff et al., 1998). Los resultados se expresaron como unidades internacionales de mieloperoxidasa por mg de proteína.

#### **5.2.8.5. Actividad de la enzima caspasa-3**

La actividad de la enzima caspasa-3 fue evaluada a las 24 y 72 h después de la isquemia/reperfusión. Para la evaluación se empleó el Kit “The Calbiochem Caspase-3 Activity Assay Kit”, el cual utiliza la especificidad de la enzima para cortar después de los residuos de aspartato en una secuencia peptídica en particular (ácido aspártico, ácido glutámico, valina, ácido aspártico, DEVD). El sustrato DEVD está marcado con un fluoróforo, la 7-amino-4-trifluorometil cumarina. Los resultados son expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF) por mg de proteína.

#### **5.2.9. Análisis estadístico**

Se llevaron a cabo múltiples comparaciones empleando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett, solamente para la evaluación del óxido nítrico se empleó una ANOVA seguida por la prueba de Tukey y para el déficit neurológico y la determinación del área de la lesión una prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Mann-Whitney. Los datos están presentados como las medias  $\pm$  S.E.M. Se consideró como criterio de significancia un valor de  $P \leq 0.05$  o  $\leq 0.001$ .



## *Resultados*

---

---

## 6. Resultados

En el siguiente apartado se procederá a describir los resultados obtenidos y que corresponden a la parte de obtención de los productos puros.

### 6.1. Obtención de los constituyentes de *Ligusticum porteri* y de los derivados semi-sintéticos

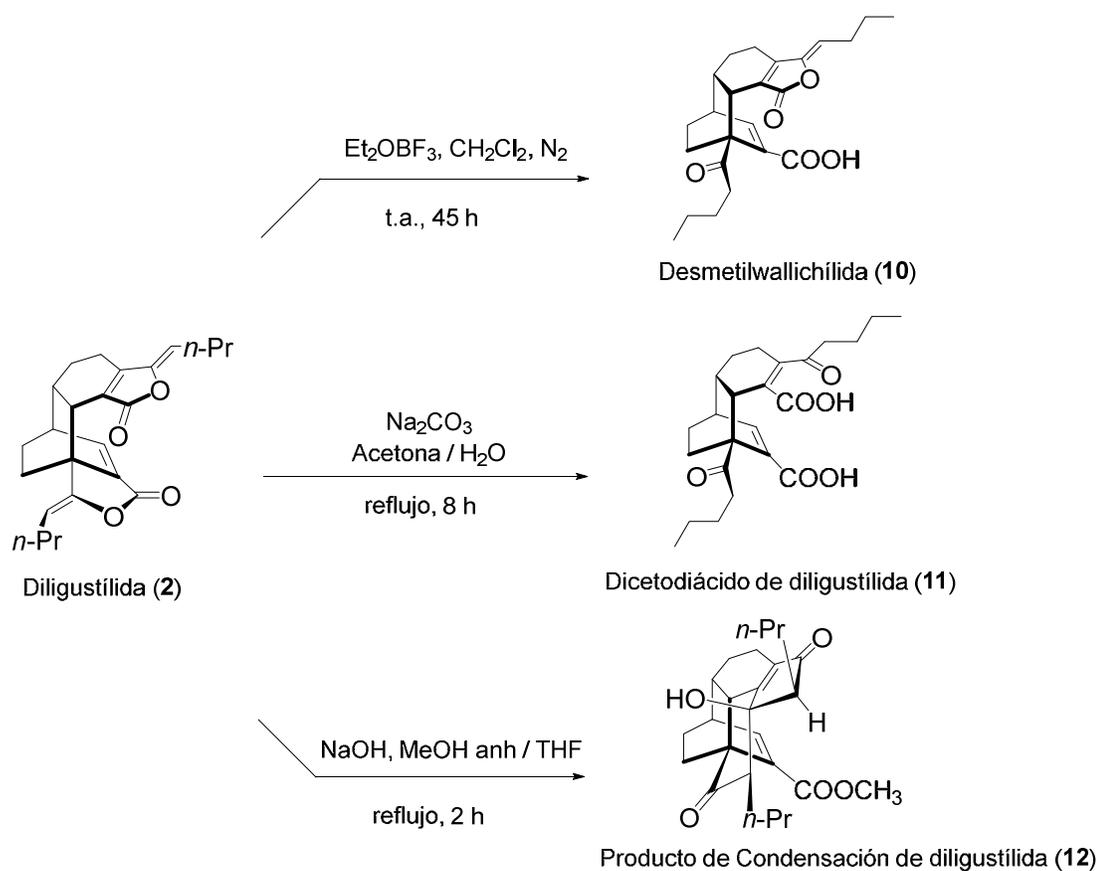
A partir de 7.7 kg de raíz de *Ligusticum porteri* se obtuvieron 768.93 g de extracto orgánico mediante maceración con acetona. La extracción se realizó en dos ocasiones, con el fin de obtener la materia necesaria para llevar a cabo las reacciones de semi-síntesis, y posteriormente las evaluaciones biológicas. En los dos fraccionamientos primarios se empleó la misma cantidad de raíz pulverizada, y se obtuvieron con diferencias mínimas, las mismas cantidades de extracto en cada ocasión.

Se llevaron a cabo re-purificaciones de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario. Mediante la aplicación de diversos procedimientos cromatográficos sucesivos, se obtuvieron los siguientes productos naturales mostrados en la **tabla 2**.

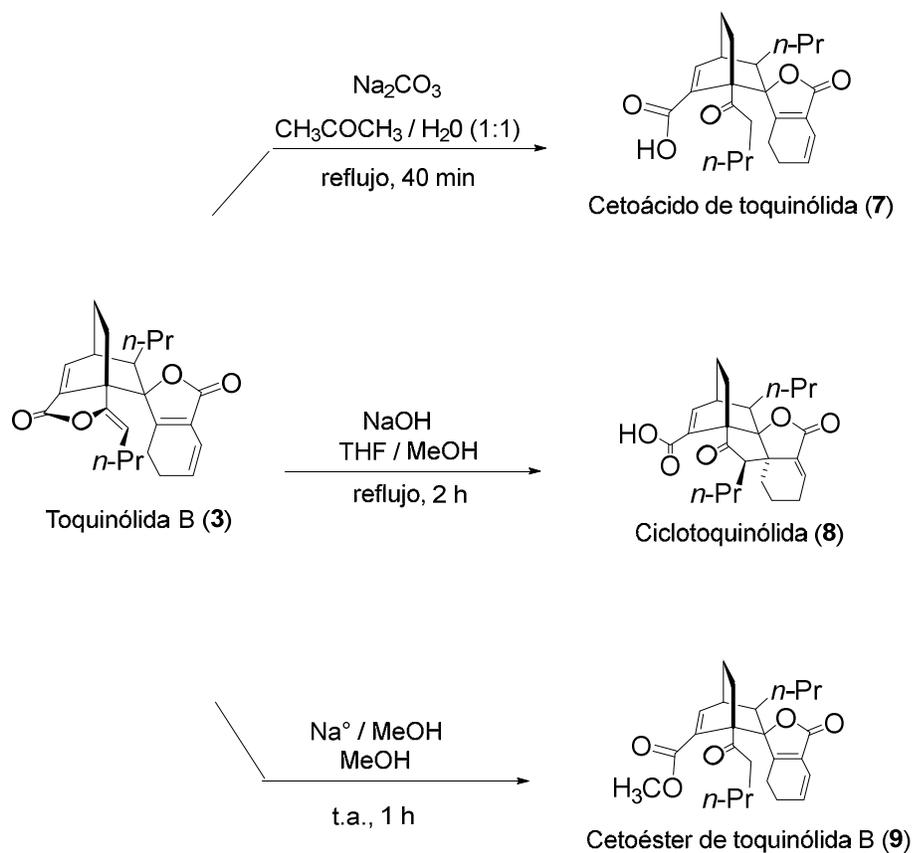
**Tabla 2. Rendimiento de los productos naturales obtenidos (g) con respecto a la raíz**

<b>Productos naturales</b>	<b>g (% de rendimiento)</b>
Z-ligustílida (1)	289.57 (3.65)
Diligustílida (2)	3.87 (0.50)
Toquinólida (3)	5.37 (0.69)
Riligustílida (4)	0.44 (0.05)
Ácido ferúlico (5)	2.30 (0.29)
$\beta$ -sitosterol (6)	1.12 (0.14)

A partir de la diligustílida (2) y toquinólida (3), se realizaron las semi-síntesis mostradas en las **figuras 12 y 13**.



**Figura. 12. Condiciones para la obtención de los derivados semi-sintéticos a partir de diligustilida (2)**



**Figura. 13. Condiciones para la obtención de los derivados semi-sintéticos a partir de toquinólida (3).**

Los productos de las reacciones previamente mencionadas, fueron separados y purificados por métodos cromatográficos, y los porcentajes de rendimiento se presentan en la **tabla 3**.

**Tabla 3. Rendimiento de la obtención de los productos semi-sintéticos (mg)**

Derivados semi-sintéticos	mg (% de rendimiento)
Cetoácido de toquinólida B (7)	93.2 (59.32)
Ciclotoquinólida B (8)	63.9 (42.32)
Cetoéster de toquinólida B (9)	56.6 (44.60)
Desmetilwallichílida (10)	63.7 (57.28)
Dicetodiácido de diligustílida (11)	71.7 (50.24)
Producto de condensación de diligustílida (12)	184.5 (39.10)

En la **tabla 4** se pueden observar los  $R_f$  para los compuestos naturales y para los derivados semi-sintéticos obtenidos con la fase móvil correspondiente.

**Tabla 4.  $R_f$  obtenido para los productos naturales y derivados semi-sintéticos**

<b>Productos naturales o derivados</b>		
<b>semi-sintéticos</b>	<b>Fase móvil</b>	<b><math>R_f</math></b>
Z-ligustílida (1)	Hexano-acetato de etilo 80:20	0.46
Diligustílida (2)	Hexano-acetato de etilo 75:25	0.34
Toquinólida (3)	Hexano-acetato de etilo 80:20	0.45
Riligustílida (4)	Hexano-acetato de etilo 75:25	0.44
Ácido ferúlico (5)	Hexano-acetato de etilo (1 gota de ácido acético) 60:40	0.50
$\beta$ -sitosterol (6)	Hexano-acetato de etilo 80:20	0.35
Cetoácido de toquinólida B (7)	Hexano-acetato de etilo 40:60	0.43
Ciclotoquinólida B (8)	Diclorometano-metanol 95:5	0.48
Cetoéster de toquinólida B (9)	Hexano-acetato de etilo 75:25	0.50
Desmetilwallichílida (10)	Hexano-acetato de etilo (1 gota ácido acético) 60:40	0.44
Dicetodiácido de diligustílida (11)	Hexano-acetato de etilo (1 gota de ácido acético) 60:40	0.37
Producto de condensación de diligustílida (12)	Hexano-acetato de etilo 70:30	0.43

Tres compuestos semi-sintéticos fueron preparados empleando microondas como un procedimiento experimental alternativo al calentamiento convencional. Este procedimiento fue ensayado en búsqueda de optimizar los rendimientos de los productos, o bien, abreviar los tiempos de reacción, ya que algunas de las reacciones previamente mencionadas requerían de tiempos prolongados para la obtención del producto deseado. Se realizaron varios experimentos y solo se informan los que resultaron convenientes a nivel preparativo.

**Tabla 5. Condiciones para la preparación de derivados semi-sintéticos empleando microondas**

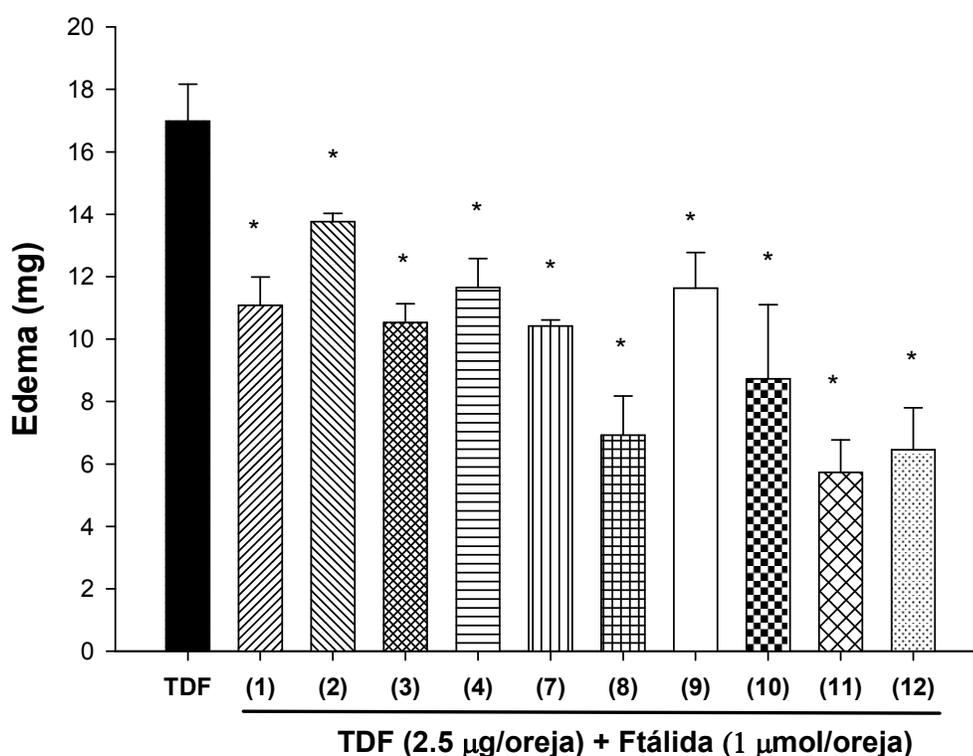
Derivados semi-sintéticos	Temperatura °C	Tiempo de reacción (min)		mg (% de rendimiento)
		Reflujo	Microondas	
		Ciclotoquinólida B ( <b>8</b> )	105	
Cetoéster de toquinólida B ( <b>9</b> )	95	60	7.30	10.89 (20)
Dicetodiácido de diligustílida ( <b>11</b> )	96	480	30	12 (21.92)
Dicetodiácido de diligustílida ( <b>11</b> )	106	480	40	19.49 (35.62)

Las condiciones de reacción para la obtención de los compuestos semi-sintéticos **8**, **9** y **11** empleando microondas se presentan en la **tabla 5**. La reacción para obtener el compuesto **8** con las condiciones seleccionadas, da como resultado la formación mayoritaria de compuestos menos polares que la ciclotoquinólida (**8**), el compuesto de interés, y casi no se recuperó materia prima. En el caso de la reacción para la obtención del producto **9**, se recuperó muy poco producto puro, y en la cromatografía de capa fina se puede observar la formación de compuestos más polares en la mezcla de reacción, y se recuperó muy poca materia prima. La síntesis del dicetodiácido de diligustílida (**11**) se realizó empleando dos condiciones. En la primera condición se obtuvo más compuesto **10**, el cual es obtenido como sub-producto de la reacción. Por lo tanto, se decidió incrementar el tiempo y la temperatura de la reacción, este cambio, permitió la formación favorecida del compuesto **11** sobre el compuesto **10**; sin embargo, la cromatografía de capa fina permite observar la formación de otros compuestos más polares. En los experimentos previamente mencionados se observó disminución en el porcentaje de rendimiento del producto deseado, el cual es inferior al obtenido para las reacciones llevadas a cabo con reflujo. Es necesario optimizar la temperatura, el tiempo y probablemente las concentraciones de las sustancias a reaccionar, para incrementar los rendimientos obtenidos.

Algunos de los productos naturales y los derivados semi-sintéticos obtenidos fueron evaluados para probar su actividad antiinflamatoria obteniendo los siguientes resultados:

## 6.2. Actividad antiinflamatoria de los productos naturales y derivados semi-sintéticos en el modelo de edema inducido con TDF

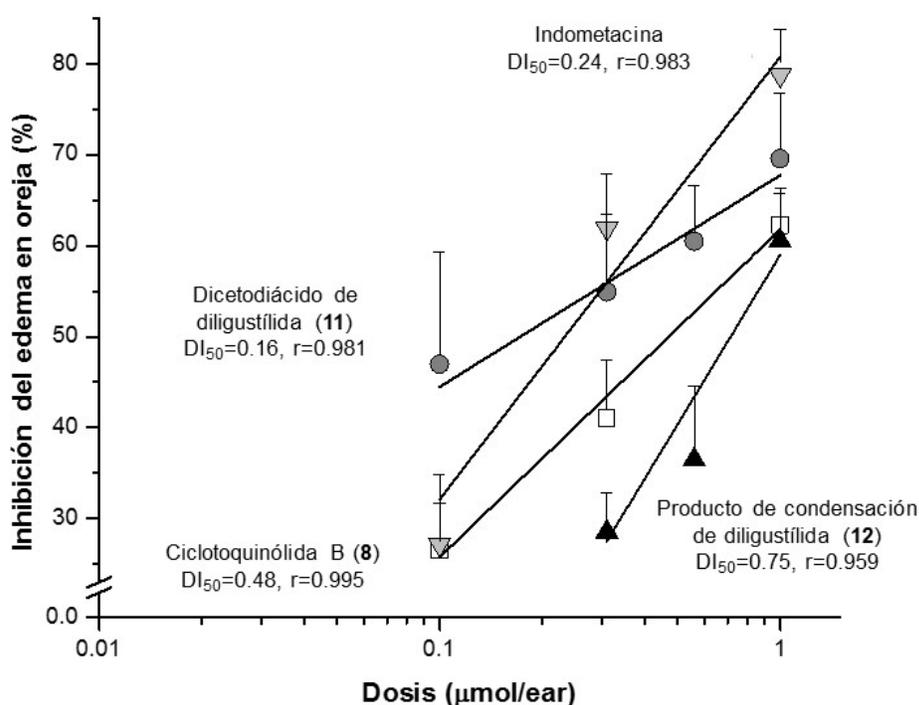
Los derivados semi-sintéticos y productos naturales tuvieron actividad antiinflamatoria en este modelo. La aplicación del TDF causa un incremento masivo en el peso de la oreja del ratón como consecuencia de la inducción del edema. El tratamiento con 1  $\mu\text{mol}$  de las ftálicas semi-sintéticas redujo el peso de las orejas tratadas previamente con TDF. El dicetodiácido de diligustílida (**11**) tuvo el mejor efecto inhibitorio contra el edema inhibiendo un 66.00% el edema, seguido por el producto de condensación de diligustílida (**12**) que inhibió un 62.00% el edema, la cicloquinólida B (**8**) inhibió 59.00%, la desmetilwallichílida (**10**) inhibió 48.55%, el cetoácido de toquinólida B (**7**) inhibió 38.59% y por último el cetoéster de toquinólida B (**9**) inhibió 31.52%. Las ftálicas naturales mostraron menor porcentaje de inhibición del edema en la oreja de ratón. De las ftálicas naturales la que presentó mejor actividad antiinflamatoria fue toquinólida (**3**), la cual inhibió 37.98% el edema, seguida por Z-ligustílida (**1**), 34.74%, riligustílida (**4**) inhibió 31.38% y la menos activa de las ftálicas naturales fue diligustílida (**2**) inhibiendo 18.96% el edema (**Fig. 14**).



**Figura. 14.** Efecto de las ftálicas naturales y derivados semi-sintéticos en el edema inducido con TDF en oreja de ratón. Los resultados se expresan como las medias  $\pm$  EEM de cuatro

animales; los compuestos se designaron como se muestra en las **Figs. 4 y 5**. El edema (mg) fue designado como el incremento de peso entre los discos de tejido de oreja no tratados y los tratados con TPA solo o con la ftálica indicada.  $*P \leq 0.001$  vs el grupo tratado solamente con TDF. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

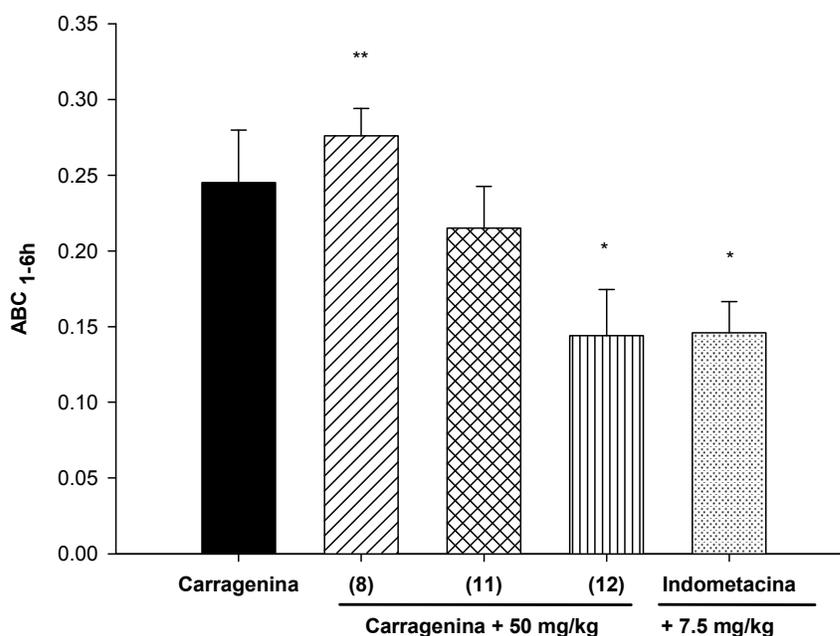
Las  $DI_{50}$  para cicloquinólida (**8**), dicetodiácido de diligustílida (**11**) y producto de condensación de diligustílida (**12**) se presentan en la **figura 15**, cabe destacar que el compuesto **11** presentó un valor inferior a la indometacina. Cicloquinólida (**8**) mostró un valor del doble del obtenido para la indometacina, y el del producto de condensación de diligustílida (**12**) fue del triple. Los valores de  $DI_{50}$  obtenidos para indometacina: 0.24, compuesto **11**: 0.16; compuesto **8**: 0.48; y compuesto **12**: 0.75.



**Figura 15. Dosis-respuesta para el efecto de las ftálicas semi-sintéticas en la inflamación inducida por TDF.** El efecto de la indometacina fue similar al efecto de las ftálicas semi-sintéticas. Los resultados se expresaron como las medias de los porcentajes de la inhibición del edema en 5 a 8 animales; se utilizó un análisis de regresión lineal para calcular la dosis que inhibe el 50% del edema  $DI_{50}$ .

### 6.3. Actividad antiinflamatoria de los derivados semi-sintéticos en el modelo de edema inducido con carragenina

El incremento gradual del edema causado por la inyección de carragenina se inhibió por la administración del producto de condensación de diligustílida (**12**) en un 47.92% a las 3 h, la indometacina mostró una inhibición de 58.33% del edema a la misma hora. El dicetodiácido de diligustílida (**11**) no mostró un efecto significativo y la cicloquinólida B (**8**) mostró un efecto proinflamatorio en este modelo. Las áreas bajo la curva (ABCs) fueron muy parecidas para la indometacina y el compuesto **12** y ambas fueron significativamente más pequeñas que el ABC del grupo administrado solamente con carragenina (**Fig. 16**).



**Figura. 16. Efecto de las ftálicas semi-sintéticas en el edema causado por carragenina.** Los cambios en el volumen de la pata (ml) fueron expresados como el área bajo la curva (ABC) del volumen de las patas graficado contra el tiempo (1-6 h), después de la inyección de carragenina. Los resultados son expresados como las medias  $\pm$  EEM de las determinaciones de 6 animales. \* $P < 0.05$  vs el grupo de carragenina, \*\* $P < 0.05$  vs el grupo de indometacina. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

Para determinar si las ftálicas afectan el reclutamiento de neutrófilos se determinó la actividad enzimática de MPO en la oreja de ratón después del tratamiento con TDF. Los compuestos **8**, **11** y

12, así como la indometacina mostraron reducción significativa en la actividad de la enzima a las diferentes dosis empleadas. El mejor efecto se observó a las siguientes dosis: para la ftálica 8: 77.6 % a 0.31  $\mu\text{mol}$ ; para la 11: 65.88% a 0.56  $\mu\text{mol}$ ; para la 12: 85.48% a 0.56  $\mu\text{mol}$ ; y para la indometacina: 91.09% a 1  $\mu\text{mol}$  (Fig. 17). El producto de condensación de diligustílida (12), así como la indometacina tienen un incremento en la actividad conforme se incrementa la dosis, en las ftálicas 8, y 11 no se observa dicho comportamiento. Las tres ftálicas presentaron actividad desde la dosis de 0.1  $\mu\text{mol/oreja}$ .

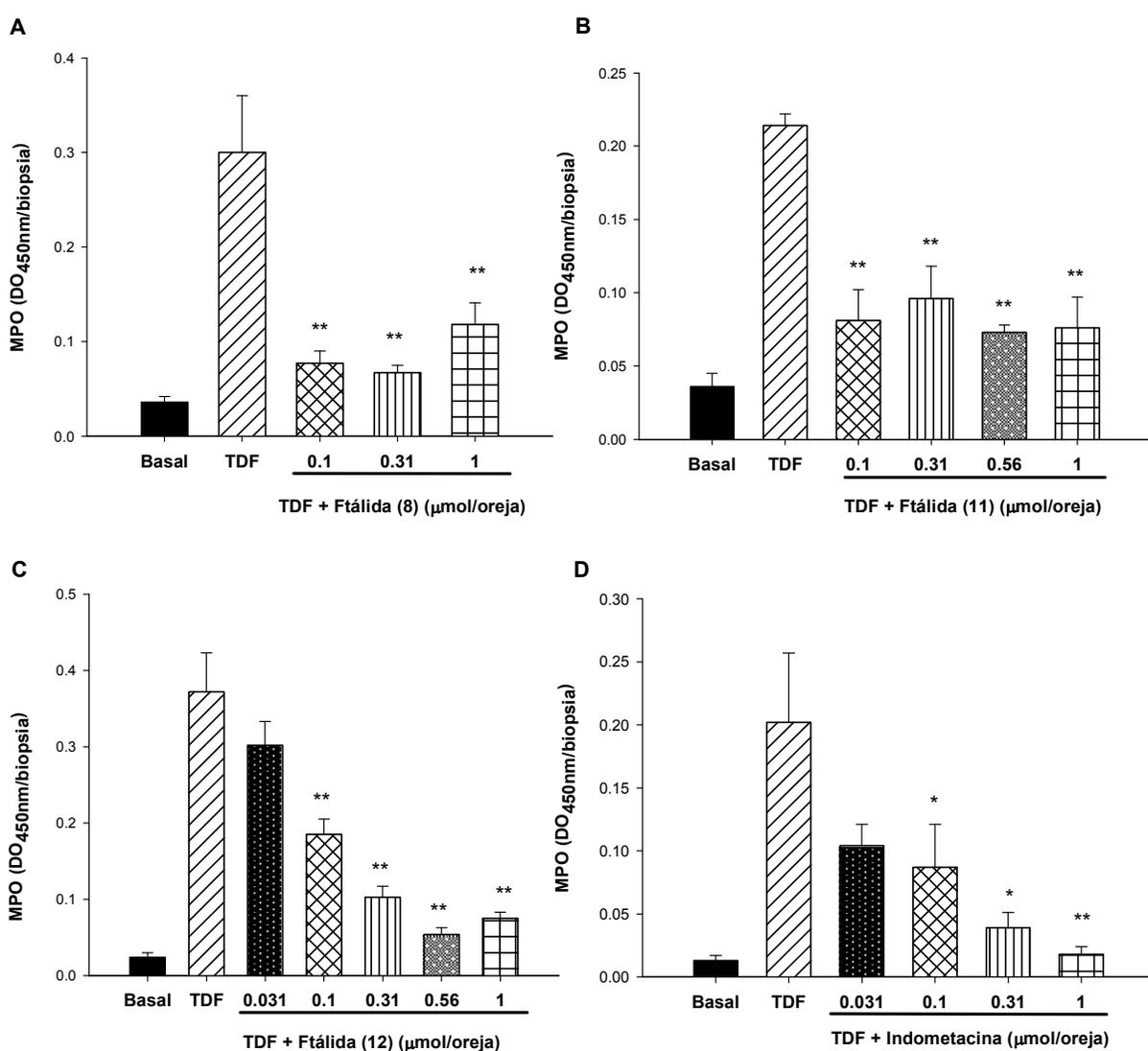
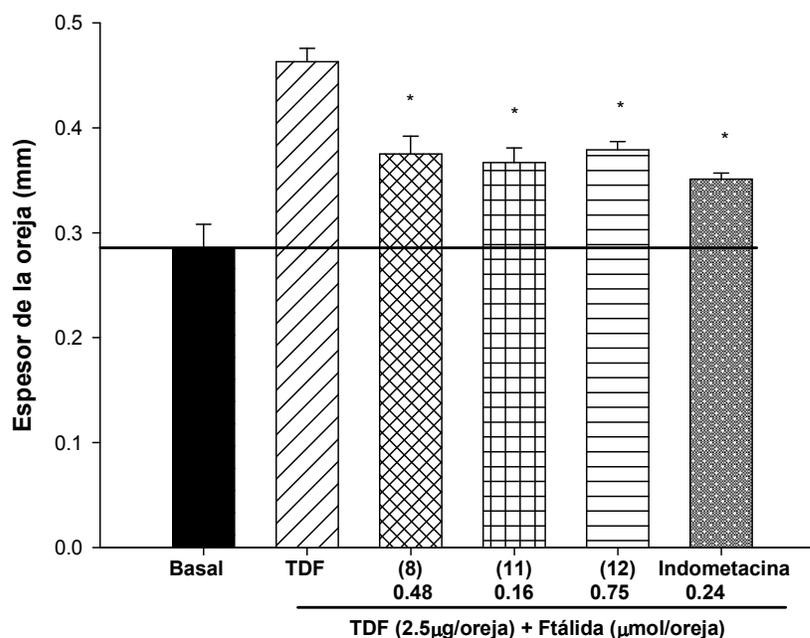


Figura. 17. Gráficas dosis-respuesta para las ftálicas semi-sintéticas en la inhibición de la actividad de la enzima MPO. Las orejas de ratón sin tratamiento (basal) y las tratadas con TDF y

con la ftálica indicada a diferentes dosis: (A) ciclotoquinólida B (**8**); (B) dicetodiácido de diligustílida (**11**); (C) producto de condensación de diligustílida (**12**); (D) indometacina. La actividad de MPO fue medida colorimétricamente ( $DO_{450nm}$ ) en homogenados de oreja inducida con edema. Los resultados están expresados como las medias  $\pm$  EEM de la actividad de MPO determinada en 5 a 8 animales.  $*P \leq 0.05$  y  $**P \leq 0.01$  vs el grupo de TDF. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

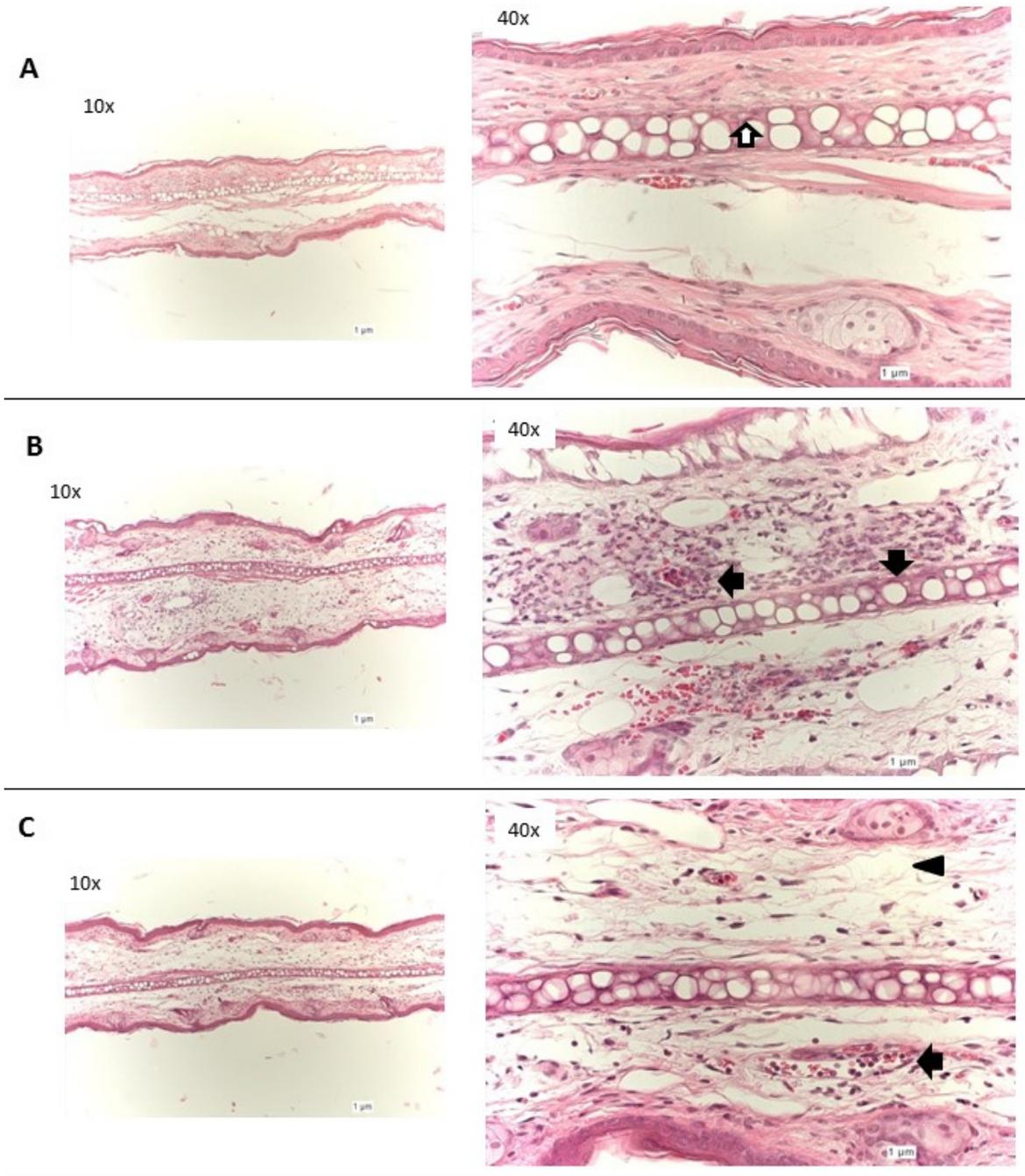
#### 6.4. Actividad inhibidora de la infiltración leucocitaria de los derivados semi-sintéticos en el modelo de TDF

El análisis histológico de las orejas de ratón demostró un incremento en el espesor de la oreja (**Fig. 18**), un incremento en el edema (**Fig. 19**) y en la infiltración de células leucocitarias (**Fig. 20**) debido a la administración de TDF. El tratamiento con las ftálicas redujo los efectos dañinos causados por el TDF y los efectos observados fueron similares a los de la indometacina. Las ftálicas **8** y **12**, mostraron mejor efecto que la ftálica **11** en la inhibición de la infiltración leucocitaria, y ambas ftálicas tuvieron una infiltración leucocitaria menor a la que se obtuvo para la indometacina. Los resultados también mostraron que las tres ftálicas, **8**, **11**, y **12** tienen efecto similar al reducir el espesor de la oreja, y a su vez tienen efecto similar al del fármaco de referencia, indometacina.



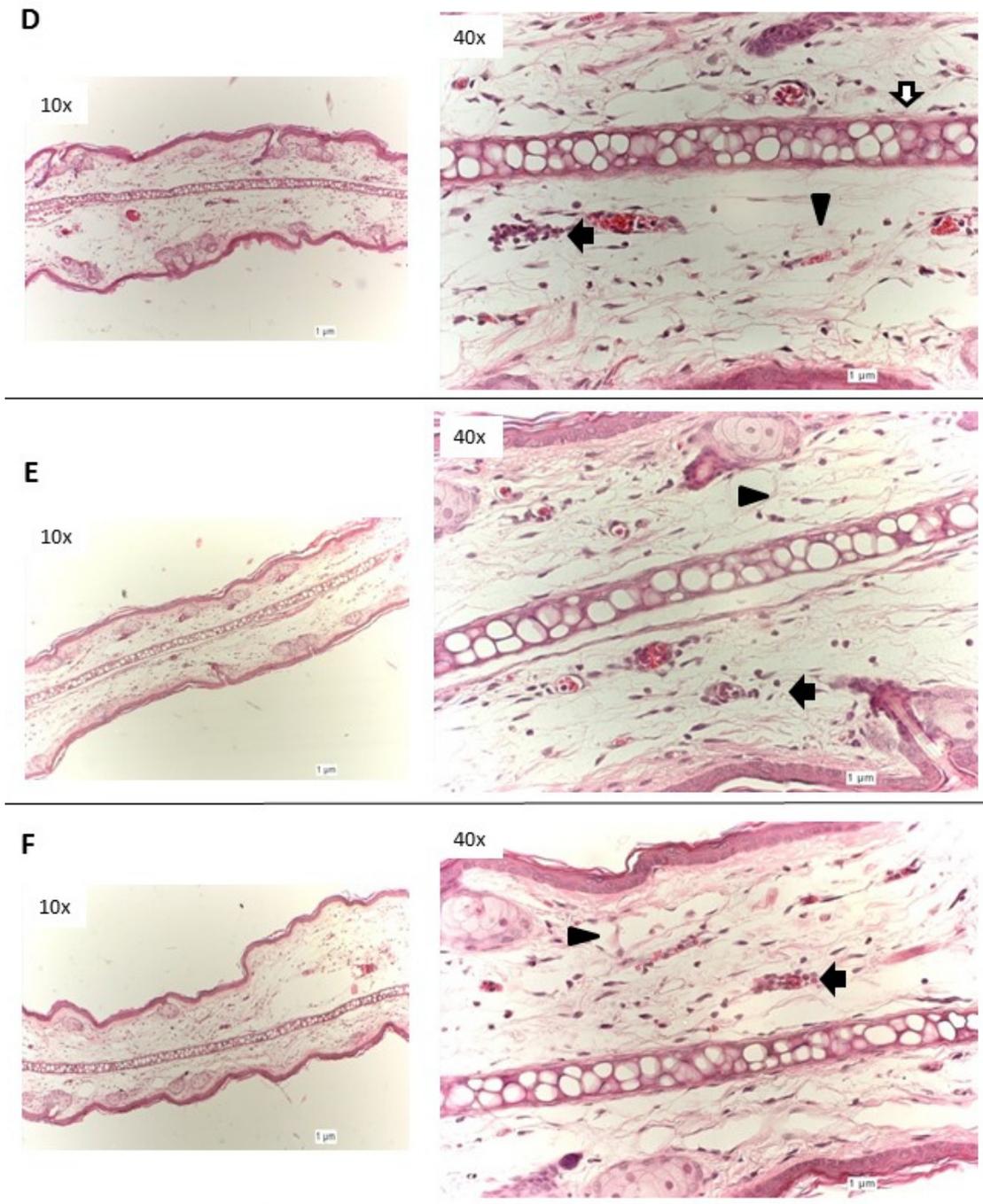
**Figura. 18.** Efecto de las ftálicas semi-sintéticas en el espesor de la oreja de ratón después de la administración del TDF. Los resultados representan las medias  $\pm$  EEM de 4 animales.  $*P \leq$

0.05 vs el grupo de TDF. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.



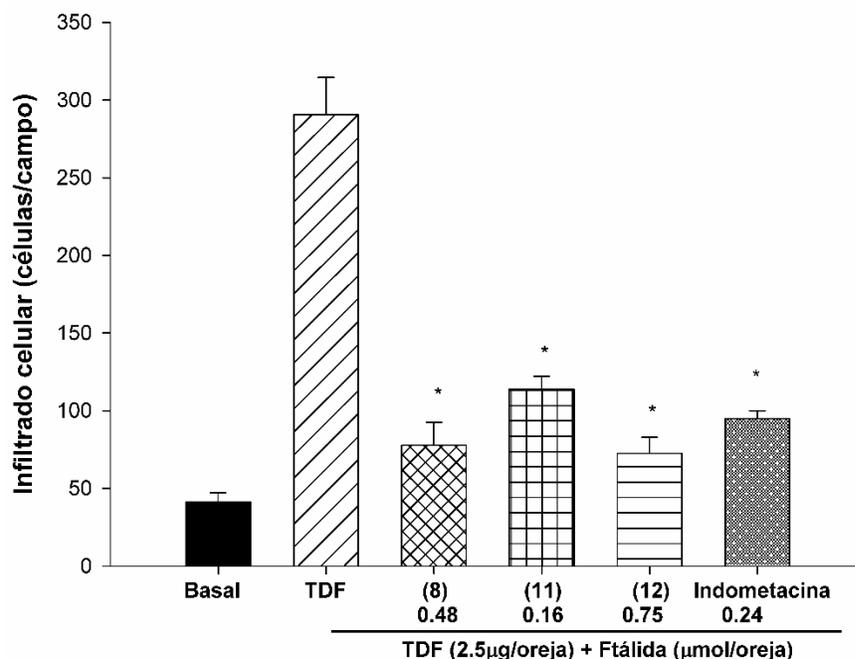
**Figura. 19. Micrografías representativas de cortes transversales de orejas de ratón administradas con TDF y las respectivas ftálicas, teñidas con hematoxilina-eosina (10 x, izquierda, 40 x, derecha, escala 1 µm). (A) Basal, (B) TDF, (C) ciclotoquinólida B, (D) dicetodiácido de diligustílida, (E) producto de condensación de diligustílida y (F) indometacina..**

Las flechas rellenas indican la presencia de leucocitos, las flechas huecas indican el cartílago y, las puntas indican el edema



**Figura. 19. Cont.** Micrografías representativas de cortes transversales de orejas de ratón administradas con TDF y las respectivas ftálicas, teñidas con hematoxilina-eosina (10 x, izquierda, 40 x, derecha, escala 1 µm). (A) Basal, (B) TDF, (C) cicloquinólida B, (D)

dicetodiácido de diligustílida, (E) producto de condensación de diligustílida y (F) indometacina. Las flechas rellenas indican la presencia de leucocitos, las flechas huecas indican el cartílago y las puntas indican el edema

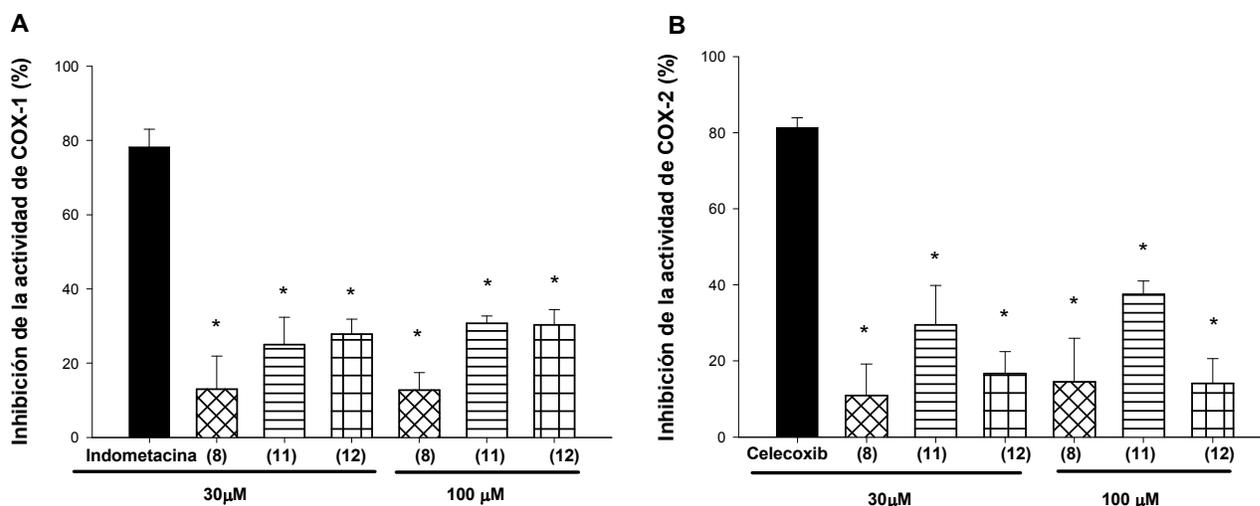


**Figura 20. Efecto de las ftálidas semi-sintéticas en el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares en tejido de oreja de ratón después de la administración del TDF.** Las barras representan las medias  $\pm$  EEM de 3 secciones. \* $P < 0.05$  vs el grupo de TDF. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

### 6.5. Inhibición de la actividad de la COX-1 y -2 con enzima pura

Las ftálidas semi-sintéticas no mostraron ser selectivas hacia alguna de las dos isoformas de la enzima COX. El producto de condensación de diligustílida (**12**) mostró una mayor inhibición de la COX-1 a ambas concentraciones empleadas 30 y 100  $\mu$ M, comparado con los otros dos compuestos, tuvo una inhibición de 27.82% y 30.32%. El dicetodiácido de diligustílida (**11**) inhibió 24.92% y 30.72%, respectivamente, la menor inhibición la mostró la ciclotoquinólida B (**8**) con 12.98% y 12.68%; el compuesto de referencia mostró 78.23% de inhibición. El dicetodiácido de diligustílida (**11**) también fue el más activo contra la COX-2 a las mismas dos concentraciones, 29.51% a 30  $\mu$ M y 37.54% a 100  $\mu$ M. El producto de condensación de diligustílida (**12**) mostró

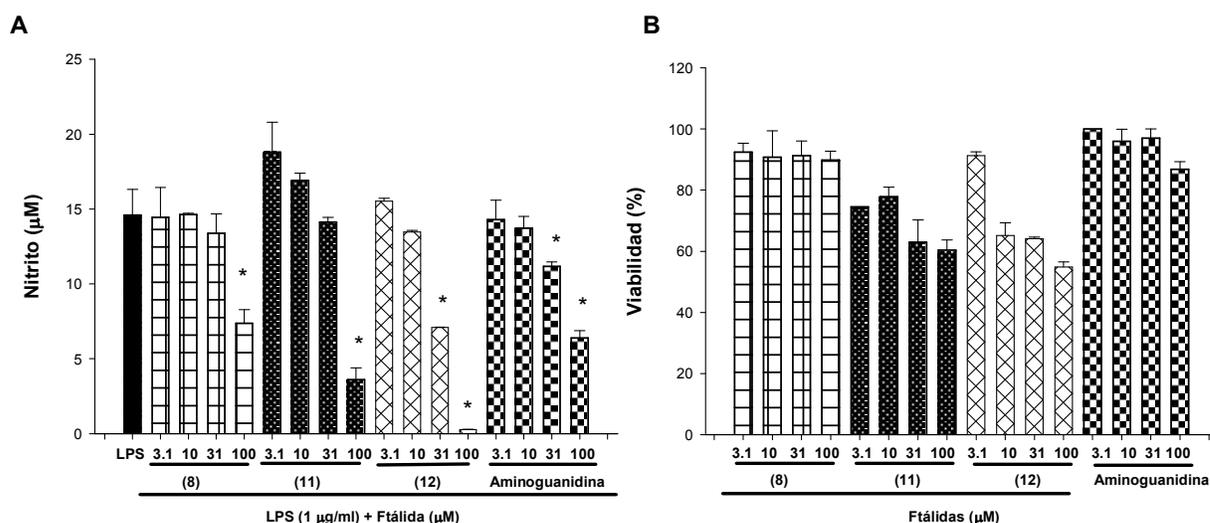
una inhibición de 16.71% y 14.11% para la mayor y menor concentración, respectivamente. Ciclotouquinólida B (**8**) tuvo una inhibición de 14.48% y 10.92% en el mismo orden (**Fig. 21**).



**Figura. 21. Efecto de las ftálidas semi-sintéticas en las actividades de las enzimas COX-1 y -2, en un ensayo con enzima pura.** Las ftálidas fueron empleadas a 30 y 100 μM y las actividades de (A) COX-1 y (B) COX-2 fueron medidas *in vitro* con un inmunoensayo. Los resultados representan las medias ± EEM de 4 determinaciones. (A) \* $P \leq 0.01$  vs el tratamiento de indometacina, (B) \* $P \leq 0.05$  vs el tratamiento de celecoxib. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

### 6.6. Inhibición de la producción de nitritos y viabilidad celular en cultivo de células de macrófagos

Las ftálidas semi-sintéticas mostraron inhibición sobre la producción de nitritos y el efecto incrementa conforme incrementa la concentración. El compuesto **11** tuvo una inhibición de 74.3%, seguido del compuesto **12** con 98.2%, y por último el compuesto **8** con 49.5%, todos evaluados a 100 μM, a esta concentración el efecto para **11** y **12** fue mejor que el del compuesto de referencia, aminoguanidina, sin embargo, la viabilidad se ve afectada con ambos compuestos a la concentración antes mencionada. Los compuestos disminuyeron la viabilidad un 60.3% y 54.8%, respectivamente. El compuesto **8** mostró el menor efecto en la inhibición de la producción de nitritos, casi no afectó la viabilidad celular y su comportamiento es similar al de la aminoguanidina (**Fig. 22**).



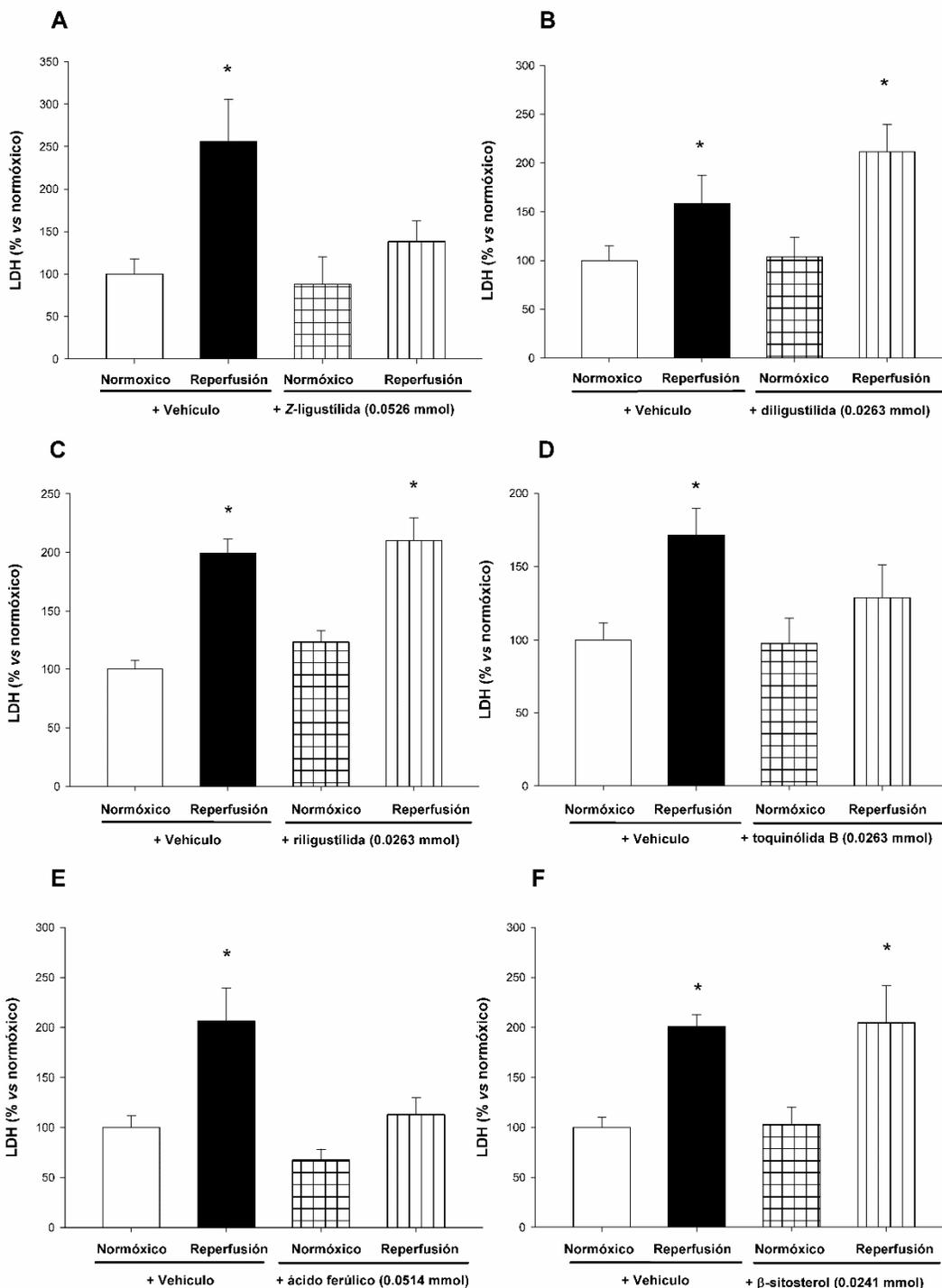
**Figura. 22. Efecto dependiente de la concentración de las ftálicas semi-sintéticas en: (A) la inhibición de la producción de nitritos en los sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 de macrófagos estimulados con LPS y (B) en la viabilidad celular.** Los resultados fueron expresados como las medias  $\pm$  EEM de 3 determinaciones por triplicado. (A)  $*P < 0.05$  vs el tratamiento de LPS. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Tukey.

A continuación se describen los resultados obtenidos correspondientes a la actividad neuroprotectora de los productos naturales y derivados semi-sintéticos evaluados en un modelo de isquemia con reperfusión *in vitro* en rebanadas de cuerpo estriado de rata:

### 6.7. Efecto inhibitorio de los productos naturales de *Ligusticum porteri* sobre la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa

La isquemia/reperfusión causó la liberación de la enzima LDH al medio, este efecto se vio disminuido por la administración de varios de los productos naturales aislados de la planta. *Z*-ligustilida (**1**) causó una reducción de 46.01% sobre la liberación de LDH. El empleo del ácido ferúlico (**5**) también causó una disminución en la liberación de dicha enzima, 45.35%. Toquinólida B (**3**) redujo en menor proporción dicha liberación, 24.48%, todas las comparaciones fueron realizadas contra el grupo de reperfusión. Algunas de las ftálicas incrementan la liberación de la

LDH, diligustílida (2), riligustílida (4) y  $\beta$ -sitosterol (6) incrementaron un 16.66, 5.31, y 16.41%, respectivamente (Fig. 23).



**Figura. 23. Efecto de los productos naturales 1-6 en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperfusion.** Representado como el porcentaje de cambio de LDH en el medio contra el grupo normoxico. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$

---

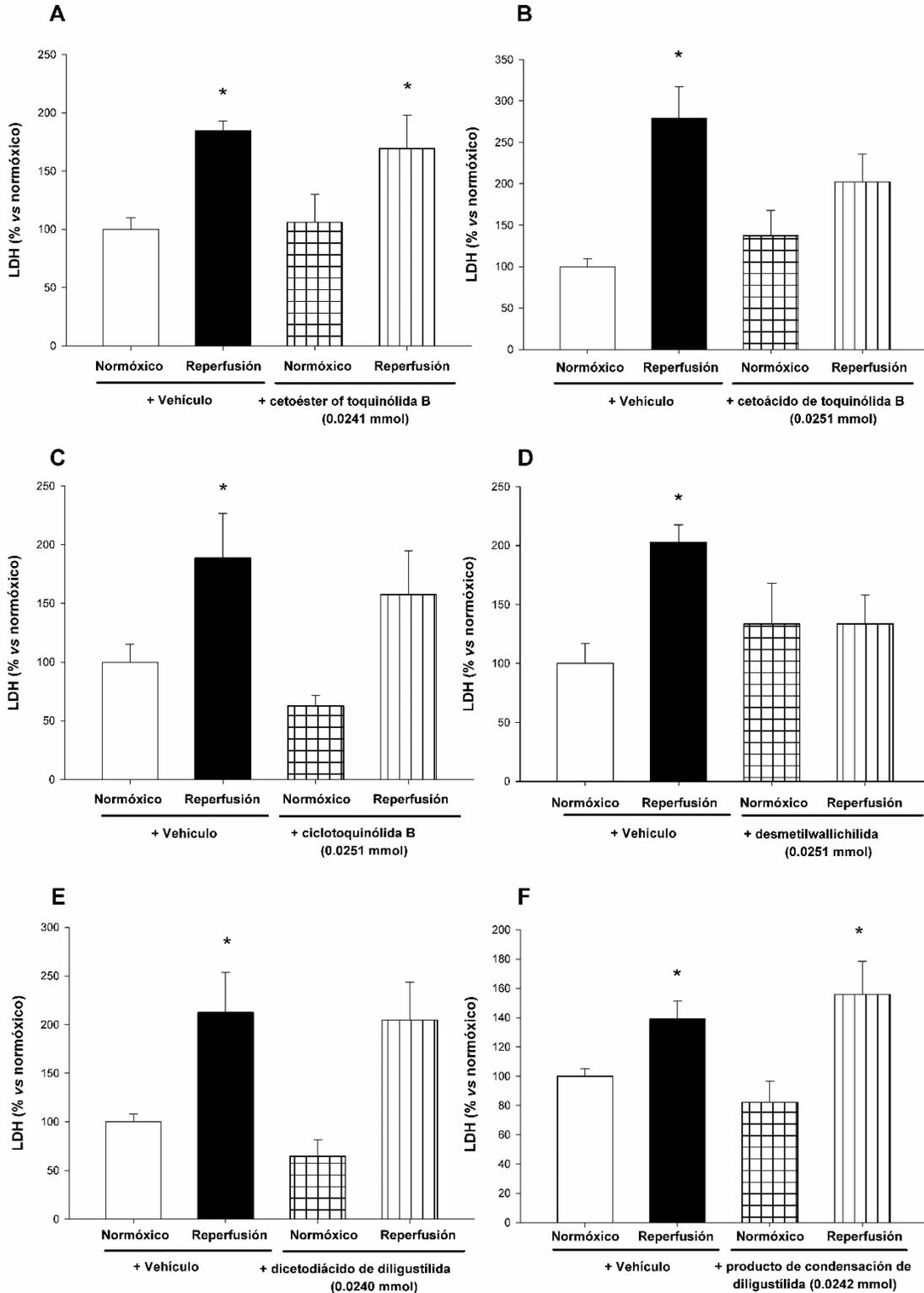
---

EEM de 8 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  vs el grupo normóxico. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

### **6.8. Efecto inhibitorio de las ftálicas semi-sintéticas de *Ligusticum porteri* sobre la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa**

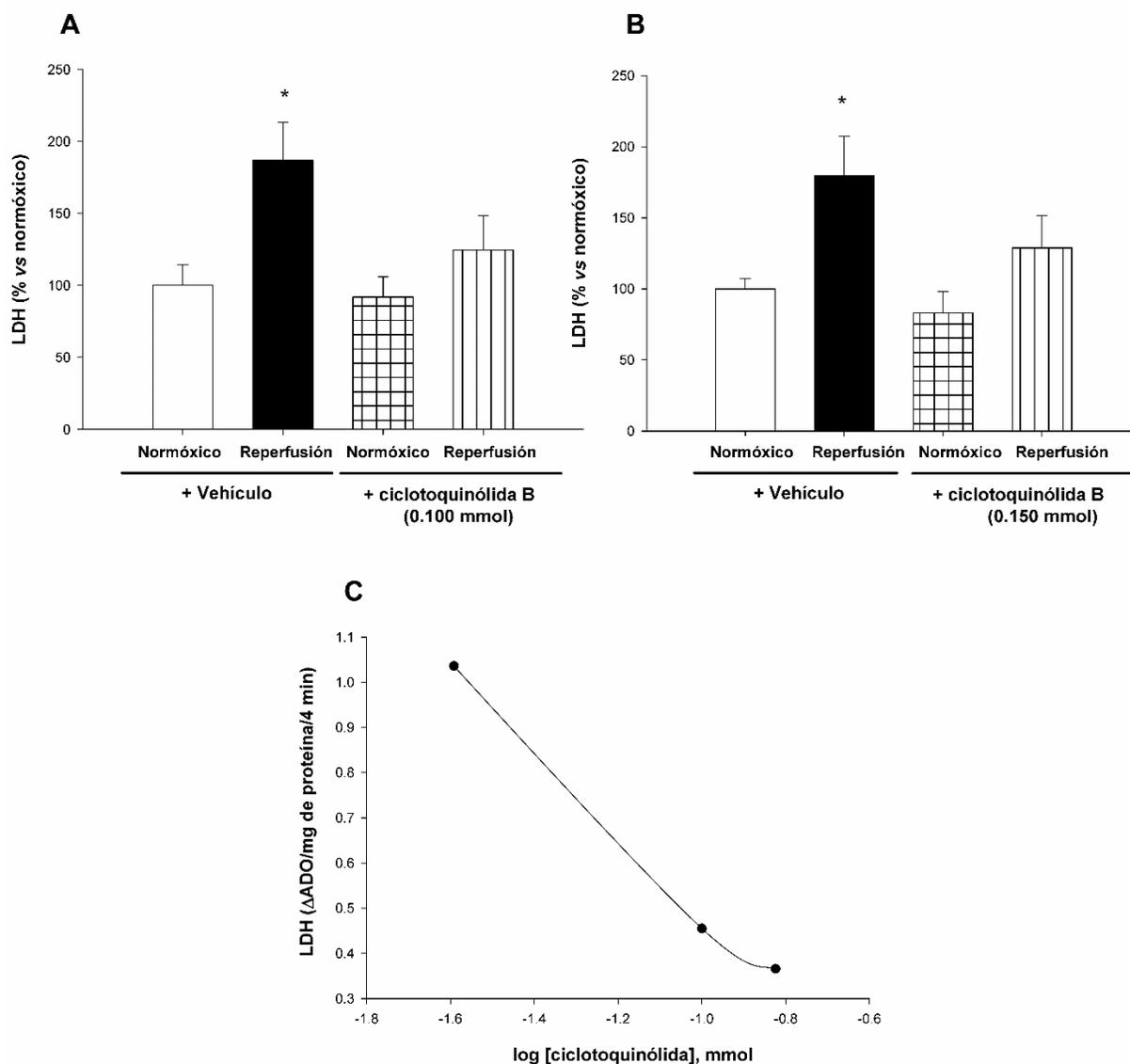
Las ftálicas semi-sintéticas evaluadas mostraron una reducción menos evidente sobre la liberación de LDH. El cetoácido de toquinólida B (**7**) redujo la liberación de LDH 27.42%, mientras que la reducción para ciclotoquinólida B (**8**) fue de 26.83%. La desmetilwallichílida (**10**) y el dicetodiácido de diligustílida (**11**) mostraron aún menor reducción de la liberación de LDH disminuyendo en 24.82 y 3.69%, respectivamente. El cetoéster de toquinólida B (**9**) y el producto de condensación de diligustílida (**12**) incrementaron la liberación de la enzima en 5.01 y 4.79%, respectivamente (**Fig. 24**).

Se incrementó la concentración de las ftálicas **8**, **10**, y **11** con el objetivo de evaluar si el efecto observado incrementaba al incrementar la concentración. La adición del compuesto **8** a las rebanadas estriatales provocó una reducción de la liberación de LDH a una concentración de 0.100 mmol y redujo 18.89% en comparación con el grupo de reperfusión, la concentración de 0.150 mmol también redujo la liberación en un 28.09%. El compuesto **10** redujo la liberación de LDH un 27.54 y 21.21% a las mismas concentraciones. El dicetodiácido de diligustílida (**11**) mostró menor efecto con una inhibición de 18.29% a 0.0961 mmol y 18.19% a 0.144 mmol. Las curvas de concentración-respuesta mostraron reducción directamente proporcional al incremento de la concentración para las ftálicas **8** y **11**. La ftálica **10** mostró reducción concentración-dependiente solamente a las concentraciones más altas que se emplearon. La concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) obtenida para los compuestos fue para ciclotoquinólida B (**8**) 0.093 mmol, para la desmetilwallichílida (**10**) 0.057 mmol y para el dicetodiácido de diligustílida (**11**) 0.105 mmol. (**Fig. 25, 26 y 27**).

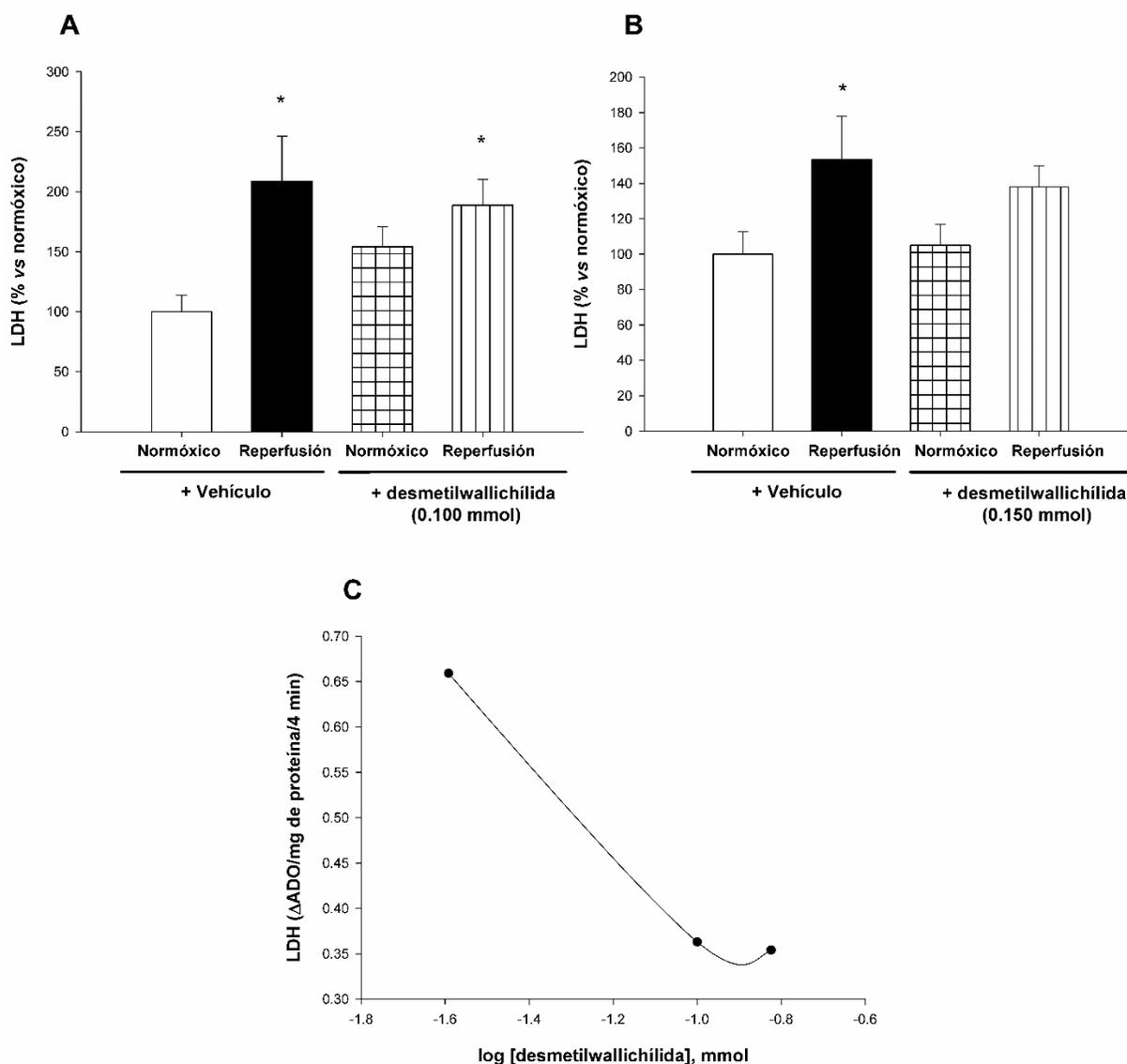


**Figura. 24. Efecto de las ftálicas semi-sintéticas 7-12 en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperusión.** Representado como el porcentaje de cambio de LDH en el medio contra el grupo normóxico. Los resultados se expresaron como las

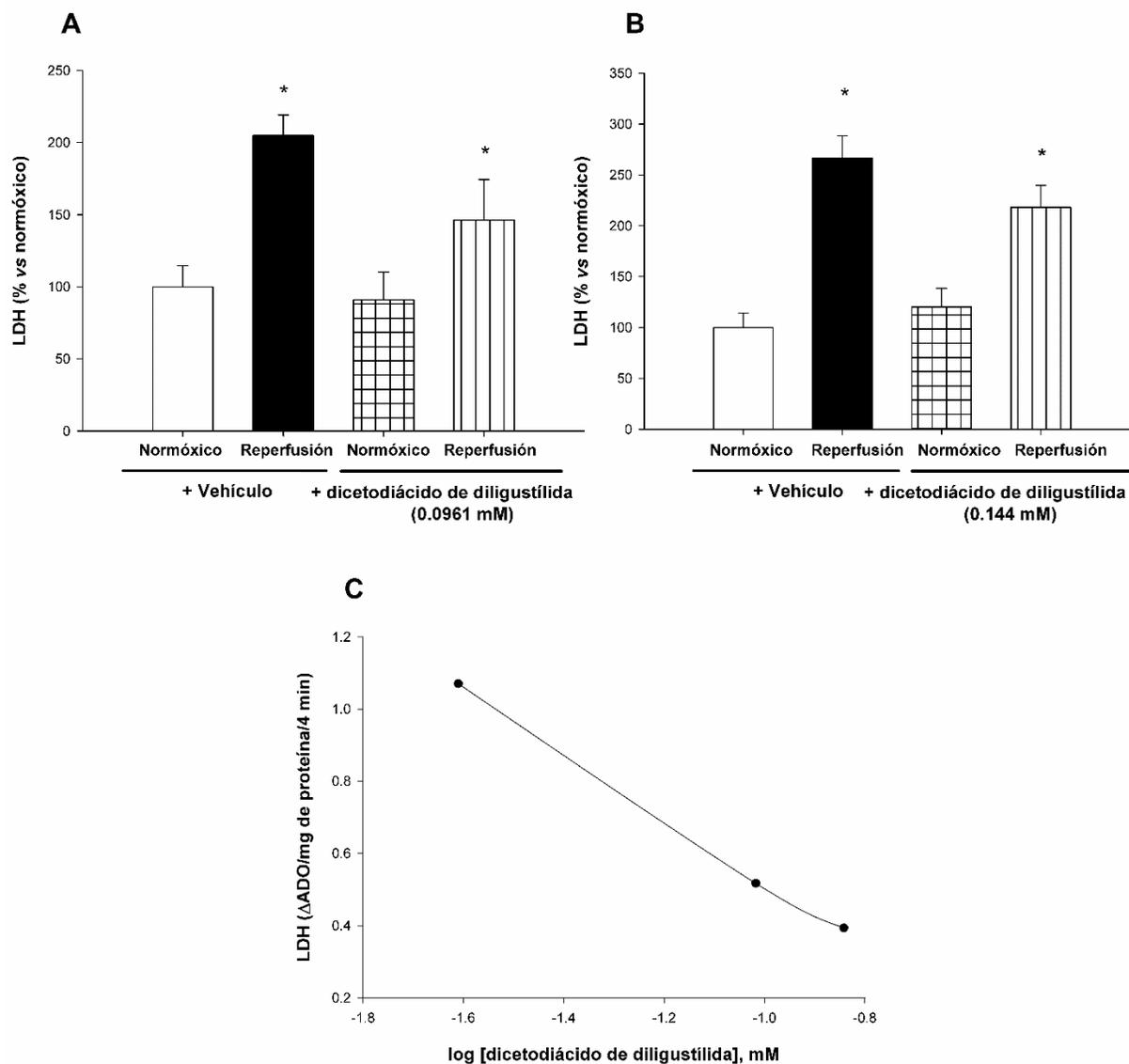
medias  $\pm$  EEM de 8 ratas por grupo.  $*P < 0.05$  vs el grupo normóxico. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.



**Figura. 25. Efecto de la ftálica semi-sintética cicloquinólida B (8) en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperusión.** Representado como el porcentaje de cambio de LDH en el medio contra el grupo normóxico. Las gráficas representan el efecto del compuesto **8** a: A) 0.100 mmol, B) 0.150 mmol y C) efecto de la concentración-respuesta del compuesto **8** a 0.0251, 0.100 y 0.150 mmol. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  EEM de 8 ratas por grupo.  $*P < 0.05$  vs el grupo normóxico. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.



**Figura. 26.** Efecto de la ftálide semi-sintética desmetilwallichilida (10) en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperusión. Representado como el porcentaje de cambio de LDH en el medio contra el grupo normóxico. Las gráficas representan el efecto del compuesto 10 a: A) 0.100 mmol, B) 0.150 mmol y C) efecto de la concentración-respuesta del compuesto 10 a 0.0251, 0.100 y 0.150 mmol. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  EEM de 8 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  vs el grupo normóxico. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.



**Figura. 27.** Efecto de la ftálide semi-sintética dicetodiácido de diligustilida (**11**) en la liberación de LDH en rebanadas de cuerpo estriado expuestas a isquemia/reperusión. Representado como el porcentaje de cambio de LDH en el medio contra el grupo normóxico. Las gráficas representan el efecto del compuesto **11** a: A) 0.0961 mmol, B) 0.144 mmol y C) efecto de la concentración-respuesta del compuesto **11** a 0.0240, 0.0961 y 0.144 mmol. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  EEM de 8 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  vs el grupo normóxico. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

Con los datos obtenidos de la actividad antiinflamatoria y la actividad neuroprotectora *in vitro*, y tomando en cuenta que el derivado semi-sintético dicetodiácido de diligustilida (**11**) resultó tener

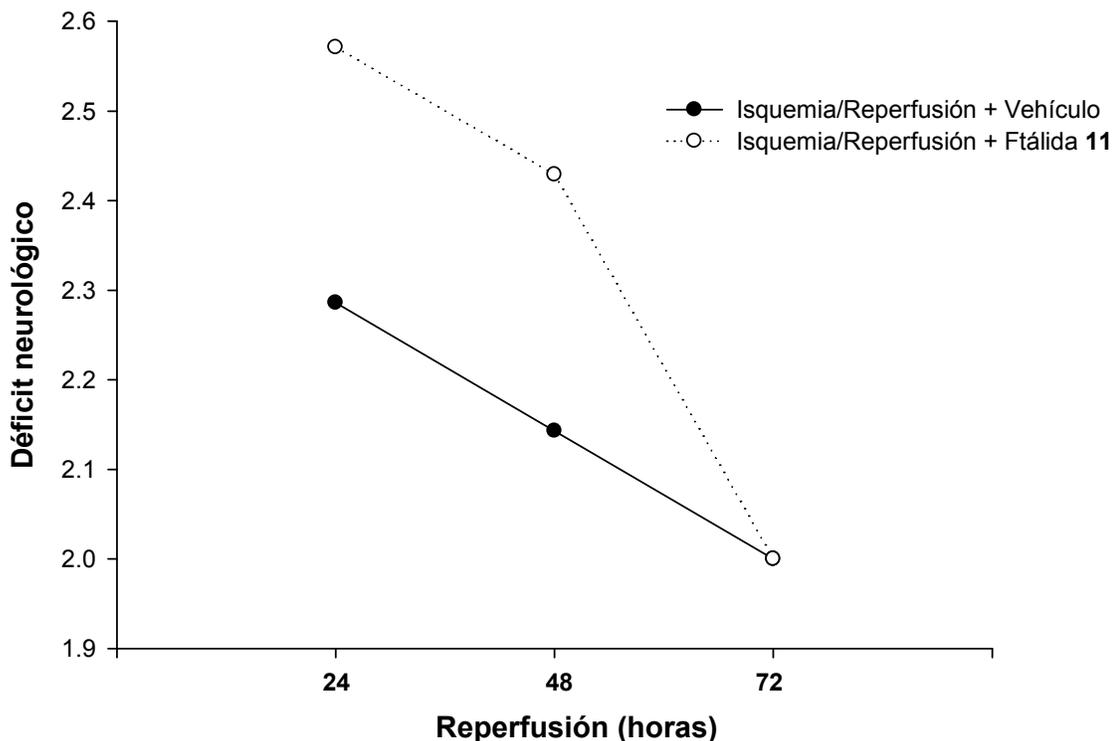
---

---

buena actividad antiinflamatoria y presentó actividad neuroprotectora en el modelo *in vitro*, dicha ftálida fue evaluada en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media *in vivo*, se evaluó únicamente la ftálida **11** principalmente debido a causas de temporalidad, ya que el modelo *in vivo* presenta una mortalidad elevada en los animales y debido a las evaluaciones que se llevaron a cabo, se requirió un número considerable de animales, lo que requirió de mayor cantidad de compuesto semi-sintetizado y purificado.

#### **6.9. Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre el déficit neurológico causado por isquemia/reperfusión**

La mortalidad del grupo control de isquemia con reperfusión, al igual que la mortalidad para el grupo tratado con la ftálida **11** fue del 25%. Sin embargo, el período del deceso fue diferente para los dos grupos, en el grupo control los decesos se presentaron cercanos a las 72 horas de reperfusión, mientras que para el grupo tratado las muertes se presentaron durante todo el tiempo de las evaluaciones, que comprenden desde 24 hasta las 72 h. Los animales que sobrevivieron presentaron deterioro neurológico y el grupo de isquemia/reperfusión que fue administrado con la ftálida **11** presentó ligero incremento en el déficit neurológico al compararse con el grupo control de isquemia, alcanzando el valor de 2.5, el cual fue el valor máximo al realizar esta evaluación, aunque esta diferencia no fue significativa (**Fig. 28**). El grupo con operación simulada y administrado con el compuesto no presentó alteraciones en el déficit neurológico, así como tampoco el grupo administrado con el vehículo.



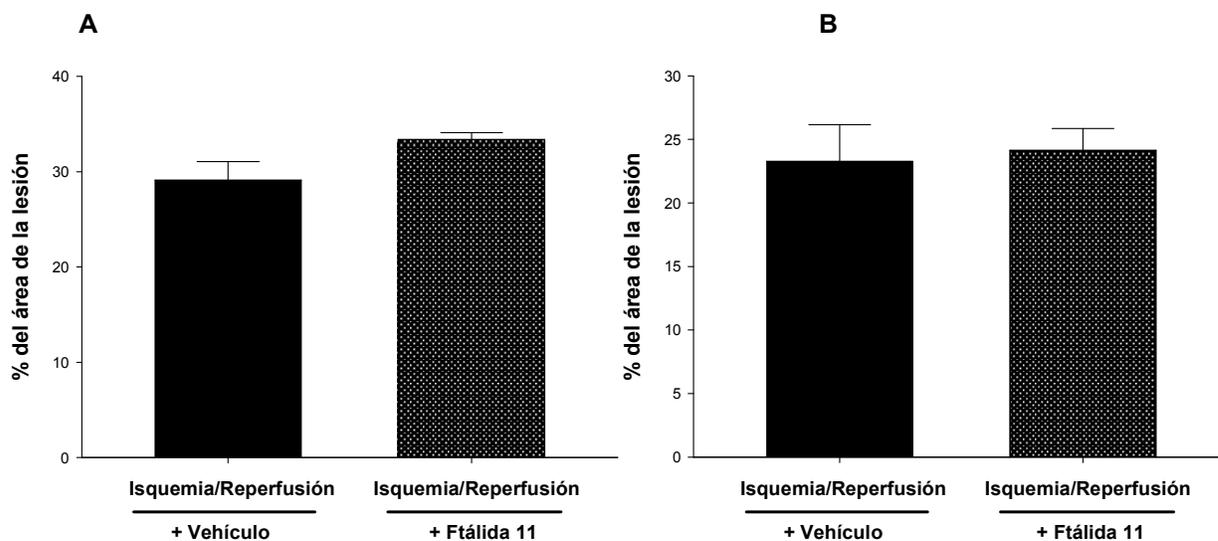
**Figura. 28.** Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en el déficit neurológico de ratas con isquemia/reperusión. Los resultados se expresan como las medias de los registros de 7 animales por grupo. Los resultados se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney.

#### 6.10. Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre el daño causado por isquemia/reperusión

El efecto en el tejido causado por el daño inducido por la isquemia con reperusión también fue evaluado en diversas áreas del cerebro, el porcentaje de tejido dañado fue casi el mismo para el grupo control de isquemia con reperusión y para el grupo de isquemia con reperusión administrado con el dicetodiácido de diligustílida (11) (Fig. 29). En esta evaluación al igual que en el déficit neurológico aparentemente hay un ligero incremento del daño al administrar el compuesto, este efecto se presenta principalmente en el tejido estriatal. El porcentaje de tejido dañado en el área del estriado fue de 30.95% para el grupo de isquemia con reperusión y 32.90% para el grupo administrado con la ftálida 11. En la región del hipocampo el comportamiento fue

---

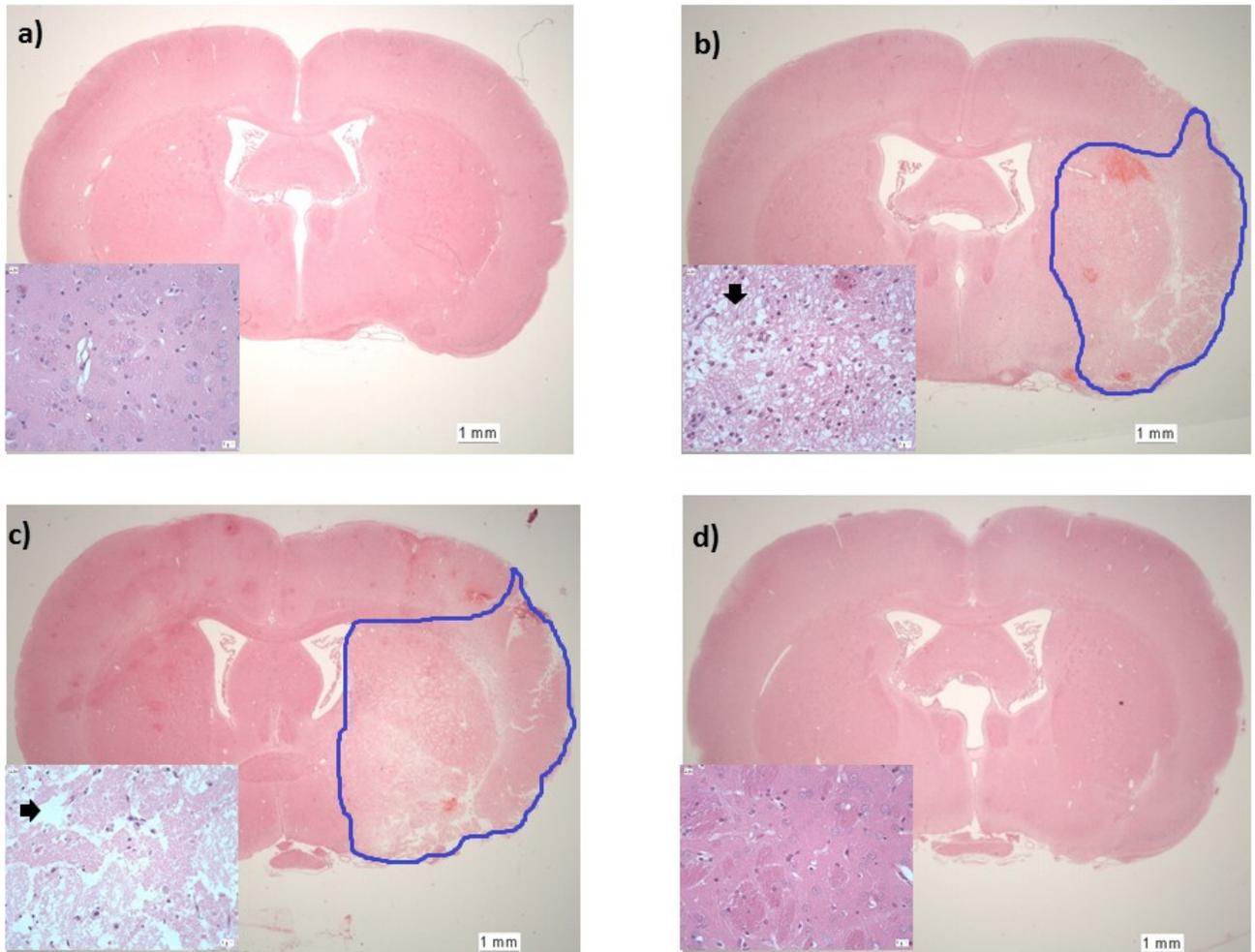
similar, con un 23.28% de daño en el grupo de isquemia con reperfusion y 24.13% en el grupo tratado con el compuesto **11**.



**Figura. 29. Porcentaje del área del infarto de ratas con isquemia/reperfusion a las cuales se les administró el dicetodiácido de diligustílida (11).** A) % del área de la lesión en estriado, B) % del área de la lesión en hipocampo. Todos los animales fueron sacrificados para examinación histológica 72 h después de la isquemia. Los resultados se expresan como las medias de 7 animales por grupo. Los resultados se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney.

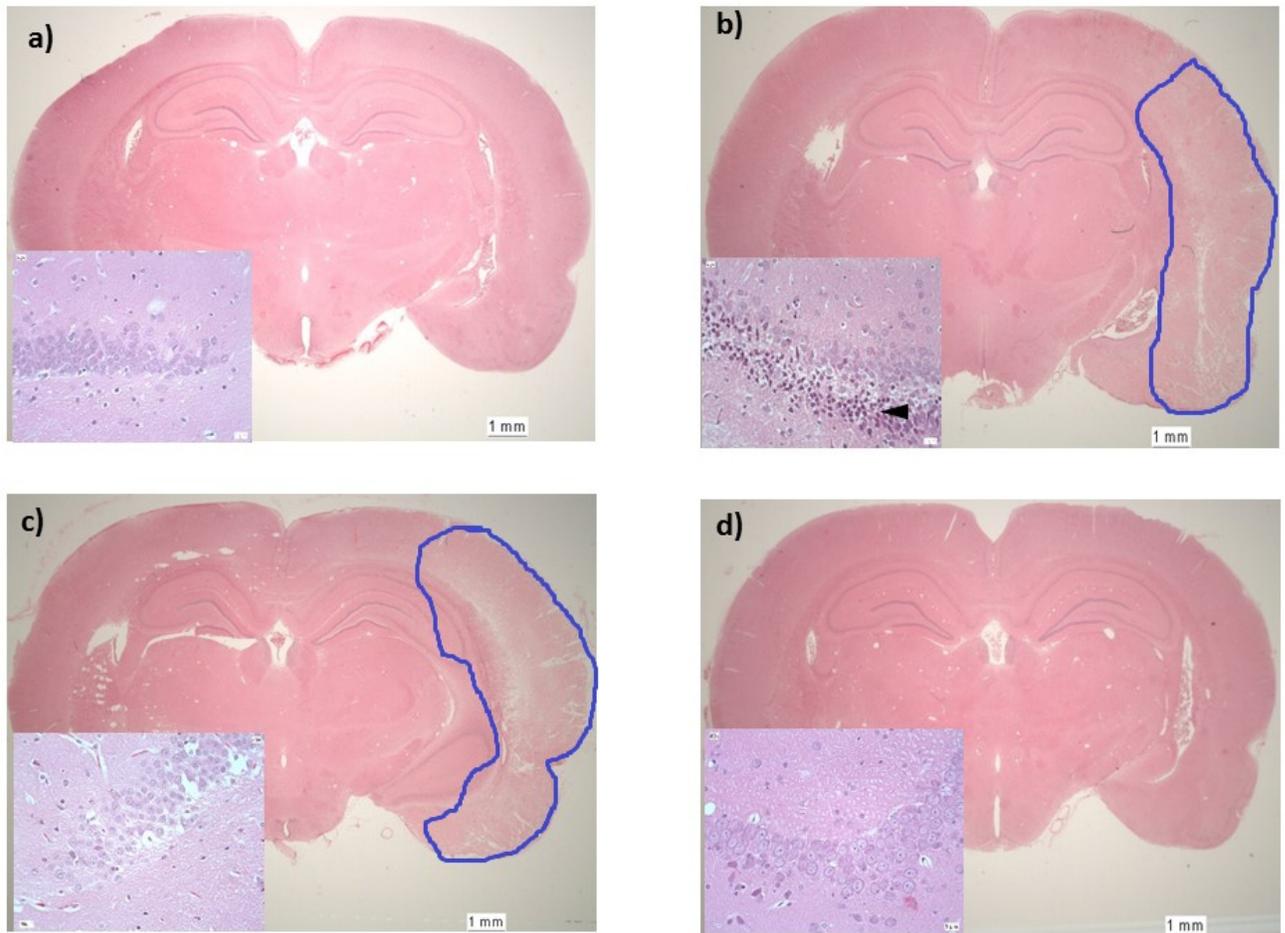
La examinación histológica nos permitió corroborar el tipo de daño. En los grupos con daño por isquemia con reperfusion, en el área de hipocampo y estriado se presentaron células picnóticas, edema y destrucción de tejido (**Fig. 30**). El grupo control de isquemia con reperfusion no presentó daño observable en corteza prefrontal, así como tampoco el grupo de isquemia con reperfusion tratado con el dicetodiácido de diligustílida (**11**), y de igual manera los grupos de operación simulada con y sin la administración del compuesto **11**. Como puede observarse en las micrografías el daño incrementa en las regiones de estriado e hipocampo en los grupos de isquemia con reperfusion tratados con el compuesto **11** (**Fig. 30 A y B, b y c**).

A



**Figura. 30. Micrografías representativas de cortes coronales de cerebros isquémicos de ratas tratadas con dicetodiácido de diligustilida (11).** A) Cortes a nivel de estriado y B) Cortes a nivel de hipocampo (escala 1 mm): a) grupo operación simulada + vehículo, b) grupo isquémico/reperfusión + vehículo, c) grupo isquémico/reperfusión + compuesto 11, d) grupo operación simulada + compuesto. En la esquina inferior izquierda fotomicrografías de la áreas evaluadas 40x. Los animales fueron sacrificados para examinación histológica 72 h después de la isquemia. Los cerebros fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas indican desintegración del tejido y las puntas indican células picnóticas.

B



**Figura. 30. Cont. Micrografías representativas de cortes coronales de cerebros isquémicos de ratas tratadas con dicetodiácido de diligustílida (11). A) Cortes a nivel de estriado y B) Cortes a nivel de hipocampo (escala 1 mm): a) grupo operación simulada + vehículo, b) grupo isquémico/reperfusión + vehículo, c) grupo isquémico/reperfusión + compuesto 11, d) grupo operación simulada + compuesto. En la esquina inferior izquierda fotomicrografías de la áreas evaluadas 40x. Los animales fueron sacrificados para examinación histológica 72 h después de la isquemia. Los cerebros fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas indican desintegración del tejido y las puntas indican células picnóticas.**

### 6.11. Efecto de la ftálide semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre la actividad de la enzima MPO evaluada en un modelo de isquemia/reperfusión

La ftálide **11** en el modelo de isquemia con reperfusión en ratas no protegió contra el incremento de la actividad de la enzima MPO. Se observó una mayor actividad de la enzima en el grupo de isquemia/reperfusión tratado con la ftálide **11** con respecto al grupo de isquemia/reperfusión administrado con el vehículo, sin embargo, este incremento no fue significativo. El área de corteza, presentó menores niveles de actividad de la enzima MPO comparado contra el cuerpo estriado e hipocampo en el grupo de isquemia/reperfusión administrado con el vehículo. En el grupo de simulación de la operación administrado con el dicetodiácido de diligustílida (**11**) los niveles de actividad de la enzima se mantuvieron bajos al igual que en el grupo de operación simulada administrado con el vehículo (Fig. 31).

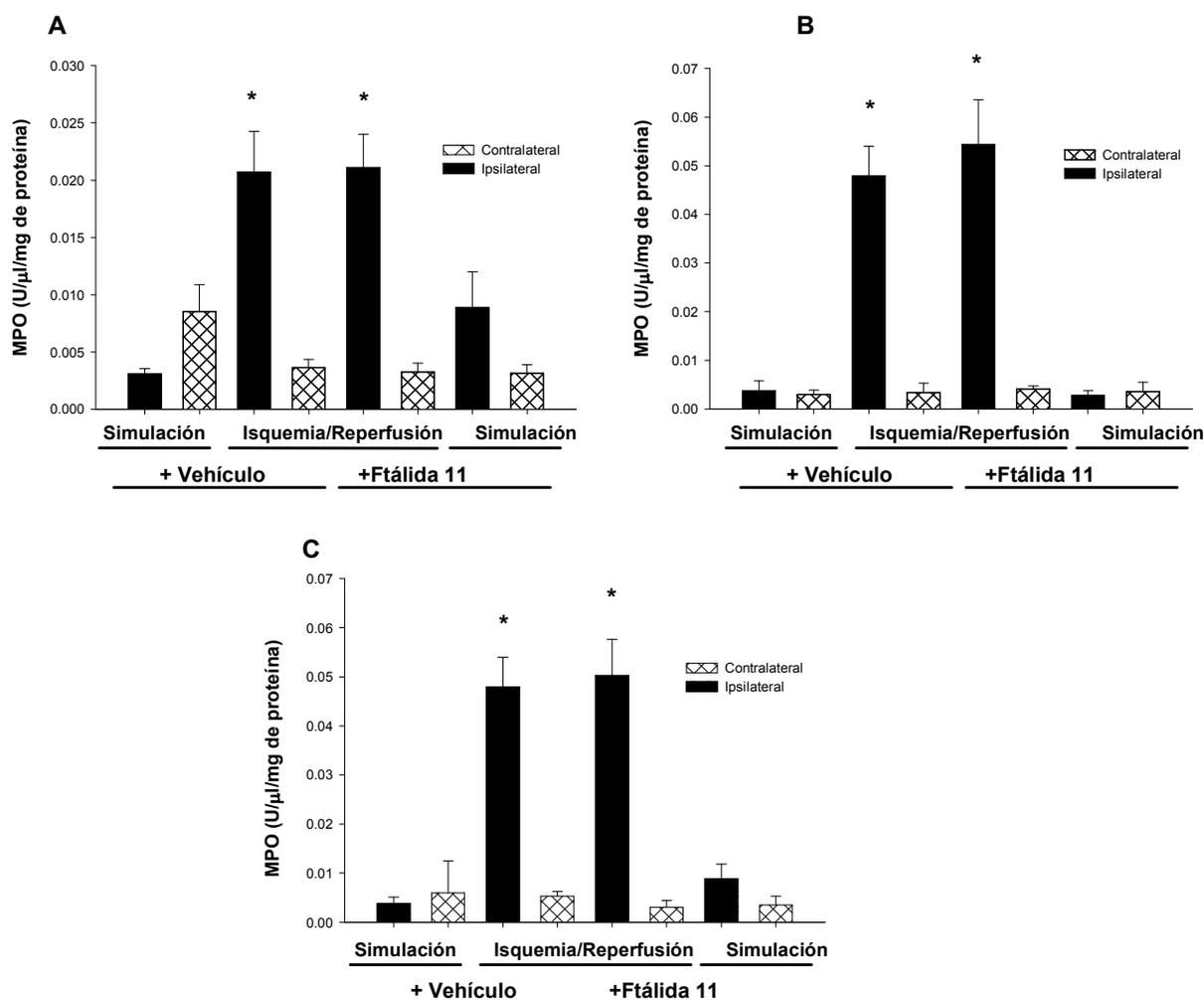


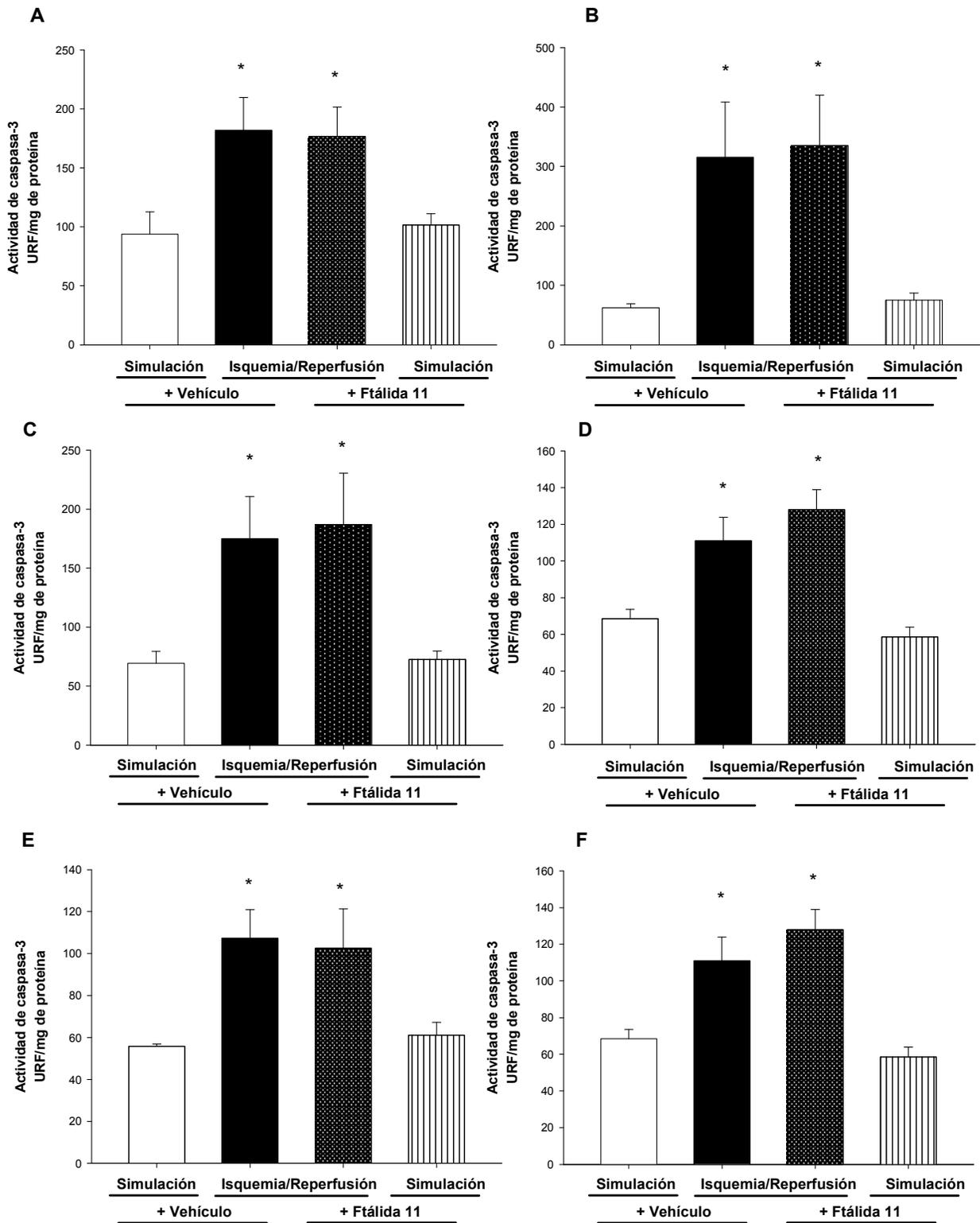
Figura. 31. Efecto de la ftálide semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en la actividad

---

**de la enzima mieloperoxidasa en ratas 48 h después de la isquemia.** Las gráficas representan el efecto del compuesto **11** en: A) corteza prefrontal, B) cuerpo estriado y C) hipocampo. Los animales se distribuyeron en 4 grupos: a) operación simulada + vehículo, b) isquemia/reperfusión + vehículo, c) isquemia/reperfusión + compuesto **11** y d) operación simulada + compuesto **11**. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  EEM de 7 ratas por grupo.  $*P < 0.05$  vs el grupo de operación simulada + vehículo y  $*P < 0.001$  vs la región contralateral. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett y una *t* de Student para las comparaciones del lado contralateral vs lado ipsilateral.

#### **6.12. Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) sobre la actividad de caspasa-3 en un modelo de isquemia/reperfusión**

La ftálida **11** fue evaluada sobre la actividad de la enzima caspasa-3. Las evaluaciones se llevaron a cabo a las 24 y 72 h. A ambos tiempos de evaluación, el grupo isquémico con reperfusión presentó incremento de los niveles de actividad de la enzima. El grupo al cual se le administró la ftálida **11** presentó ligero incremento en los niveles de actividad de caspasa al compararlo contra el grupo de isquemia con reperfusión tratado con el vehículo (**Fig. 32**).



**Figura. 32.** Efecto de la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (11) en la actividad de la enzima caspasa-3 en ratas, 24 y 72 h después de la isquemia. Las gráficas representan el

efecto del compuesto **11** en: Corteza prefrontal A) 24 h post-isquemia, B) 72 h post-isquemia, estriado C) 24 h post-isquemia, D) 72 h post-isquemia e hipocampo E) 24 h post-isquemia, F) 72 h post-isquemia. Los animales se distribuyeron en 4 grupos: a) operación simulada, b) isquemia/reperfusión, c) isquemia/reperfusión + compuesto **11** y d) operación simulada + compuesto **11**. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  EEM de 7 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  vs el grupo de operación simulada + vehículo. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Dunnett.

En la tabla 6 se resumen los porcentajes de inhibición obtenidos para las diversas actividades biológicas obtenidos en este trabajo para los constituyentes de *Ligusticum porteri*.

**Tabla 6. Resumen de las actividades biológicas y porcentajes de inhibición obtenidos**

Compuesto	Inflamación (% de inhibición)					LDH (% de inhibición)
	TDF	Carragenina	MPO	COX-2	Nitritos	
Z-ligustílida (1)	34.74	ND	ND	ND	ND	46.01
Diligustílida (2)	18.96	ND	ND	ND	ND	-16.66
Toquinólida B (3)	37.98	ND	ND	ND	ND	24.48
Riligustílida (4)	31.38	ND	ND	ND	ND	-5.31
Ácido ferúlico (5)	ND	ND	ND	ND	ND	45.35
$\beta$ -sitosterol (6)	ND	ND	ND	ND	ND	-16.41
Cetoácido de toquinólida B (7)	38.59	ND	ND	ND	ND	27.42
Ciclotoquinólida (8)	59.00	-27.08	77.60	14.48	49.5	26.83
Cetoéster de toquinólida B (9)	31.52	ND	ND	ND	ND	-5.01
Desmetilwallichílida (10)	48.55	ND	ND	ND	ND	24.82
Dicetodiácido de diligustílida (11)	66.00	1.46	65.88	37.54	74.30	3.69
Producto de condensación de diligustílida (12)	62.00	47.92	85.48	16.71	98.20	-4.79

ND= No determinado



## *Discusión*

---

---

## 7. *Discusión*

Los productos naturales tienen una amplia diversidad química y bioquímica que los hace favorables para el descubrimiento de fármacos o agentes terapéuticos (Koehn and Carter, 2005). El género *Ligusticum* está conformado de aproximadamente 40 a 60 especies que crecen en regiones montañosas en ciertas partes del mundo (Turi and Murch, 2011) y algunas han sido tradicionalmente usadas para el tratamiento de enfermedades (Beck and Chou, 2007; Terrell and Fennell, 2009). *Ligusticum porteri* es considerada uno de los remedios herbolarios más importantes usados tradicionalmente por las comunidades del norte de México y sur de los Estados Unidos (Beck and Chou, 2007). Algunos productos naturales han sido aislados de la planta, entre los que se incluyen ftálicas (León et al., 2011; Mooney et al., 2015), compuestos fenólicos, hidrocarburos monoterpénicos, etc (León et al., 2011). Algunos de los constituyentes aislados de la planta también han sido encontrados en otras especies de *Ligusticum*, como *Ligusticum chuanxiong* (Li et al., 2012), así como en plantas de otros géneros que también pertenecen a la familia Umbelliferae, como lo es *Angelica sinensis* (Fang et al., 2012).

*Ligusticum chuanxiong* y *Angelica sinensis*, son dos plantas que se han empleado tradicionalmente en China, Japón y Corea, en donde se preparan como decocciones, principalmente de la raíz, para el tratamiento de diversas enfermedades (Fang et al., 2012; Li et al., 2012; Yang et al., 2012). Entre los constituyentes que comparten las tres especies (*L. porteri*, *L. chuanxiong* y *A. sinensis*) se encuentran la Z-ligustílida (**1**), la Z-butilidenftálica y el ácido ferúlico (**5**); en el caso de *L. chuanxiong* y *L. porteri*, las investigaciones químicas además han confirmado que comparten constituyentes como toquinólida B (**3**), riligustílida (**4**) y diligustílida (**2**, llamado también levistólida A).

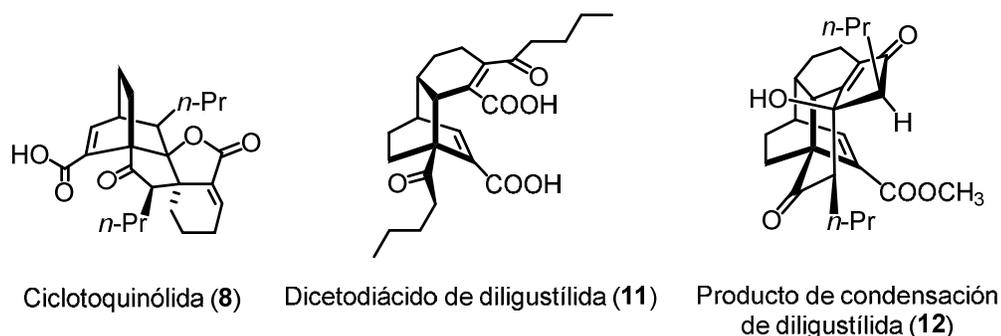
Algunos constituyentes han demostrado tener actividad biológica diversa, sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se han enfocado en la evaluación de la actividad de Z-ligustílida (**1**), Z-butilidenftálica y del ácido ferúlico (**5**), ya que los primeros dos compuestos, son los constituyentes mayoritarios en la planta y el tercero es una sustancia estructuralmente simple y disponible. La estabilidad de los compuestos es un rubro de interés sobresaliente a tomar en consideración para la realización de las evaluaciones biológicas. Mediante observaciones experimentales realizadas durante la purificación y manipulación de las sustancias en nuestro grupo de investigación, es posible afirmar que el ácido ferúlico (**5**), así como el  $\beta$ -sitosterol (**6**) son compuestos muy estables. Sin embargo, la Z-ligustílida (**1**) y el resto de las ftálicas naturales y

---

semi-sintéticas aisladas, son menos estables y deben mantenerse bajo refrigeración y almacenadas bajo atmosfera de nitrógeno. La estabilidad y el porcentaje de rendimiento de las ftálicas podría ser la razón del porque la mayoría de las investigaciones se han centrado en las dos ftálicas mayoritarias.

En cuanto a las actividades biológicas se ha reportado que *Z*-butilideneftálica tiene actividad vasorelajante (Ko et al., 1998), analgésica (Juárez-Reyes et al., 2014), larvicida (Miyazawa et al., 2004), *Z*-ligustílica (**1**) ha sido reportada por ser activa contra asma (Beck and Chou, 2007), por tener efecto analgésico (Du et al., 2007), antitrombótico (Zhang et al., 2009), antiespasmódico (Du et al., 2006) y antiinflamatorio (Chung et al., 2012; Liu et al., 2005), entre otras actividades reportadas, el ácido ferúlico (**5**) posee actividad antitrombótica (Yang et al., 2012), antioxidante (Itagaki et al., 2009) y se han reportado diversas investigaciones en las que se menciona que tiene actividad contra isquemia cerebral (Cheng et al., 2010; Koh, 2012) y tanto *Z*-ligustílica (**1**) como el ácido ferúlico (**5**) han mostrado tener actividad contra isquemia cerebral con reperfusión (Cheng et al., 2010; Kuang et al., 2006; Peng et al., 2013) en modelos *in vivo* e *in vitro*. Entre las ftálicas diméricas, la diligustílica (**2**) tiene actividad analgésica (Juárez-Reyes et al., 2014) y antihiperглиcémica (Brindis et al., 2011), la toquinólida B (**3**) reduce la viscosidad en la sangre (Lin et al., 2005), y ambas ftálicas incrementan el tiempo de hipnosis inducido por pentobarbital (León et al., 2011), además de tener actividad antiinflamatoria (Huang et al., 2013). Riligustílica (**4**) tiene efecto inhibitorio sobre la unión del diazepam al receptor de GABA<sub>A</sub> (Deng et al., 2006), lo que sugiere efecto sedante. Además de la exploración de las actividades biológicas de los constituyentes de la planta, la reactividad química de las ftálicas también se ha explorado (Beck and Stermitz, 1995; Quiroz-García et al., 2003; Radcliff et al., 2008; Rios et al., 1998a; Rios et al., 1998b). En este proyecto se realizaron reacciones de derivatización en las cuales se hidrolizaron lactonas en medio básico, y ácido y se llevaron a cabo condensaciones intramoleculares, se realizaron estas reacciones ya que se habían realizado previamente en nuestro grupo de trabajo y algunas se obtuvieron con buenos rendimientos, además algunos de los productos de reacción fueron evaluados en un modelo de actividad sedante, obteniendo buenos resultados. Tomando en consideración la evaluación de las actividades biológicas y la exploración de la reactividad química, este proyecto de investigación se centró en la evaluación de la actividad antiinflamatoria y neuroprotectora contra isquemia cerebral de algunos de los constituyentes de *Ligusticum porteri* y algunos derivados semi-sintéticos.

La inflamación involucra una respuesta compleja del cuerpo modulada por diversos mediadores químicos (Souren et al., 2012), que responden a estímulos dañinos (Lo Faro et al., 2014), existen diversos modelos para evaluar agentes antiinflamatorios, entre los que se incluyen a los que comprometen a la piel. La piel es el primer contacto con el ambiente exterior, y se encuentra constantemente expuesta a daño e invasión por patógenos (Otuki et al., 2005). Existen diversos agentes empleados en los modelos animales para inducir inflamación cutánea, entre los que se encuentran el aceite de croton, el TDF, la cantaridina, el aceite de mostaza, el ácido araquidónico, el ditranol, la capsaicina, entre otros (Gábor, 2002). El TDF causa vasodilatación y eritema en las primeras 2 h de su aplicación, entre la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> h las orejas empiezan a inflamarse (Gábor, 2002), el TDF se ha asociado con el reclutamiento de neutrófilos y células mononucleares, acompañado por la inducción temprana de la COX-2 (Lee et al., 2003). Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación indican que los productos naturales y las ftálicas semi-sintéticas presentan actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación inducido en oreja de ratón, principalmente las tres ftálicas semi-sintéticas, el dicetodiácido de diligustílida (**11**), el producto de condensación de diligustílida (**12**) y la ciclotoquinólida B (**8**) (**Fig. 33**) inhibieron de manera sobresaliente el edema en la oreja de ratón.



**Figura 33. Ftálicas más activas en el modelo de edema inducido con TDF**

A la dosis de 1  $\mu\text{mol}$ /oreja los tres compuestos presentaron actividad reduciendo el edema. La examinación histológica del tejido de orejas de ratón nos permitió confirmar que existía una reducción en el espesor (edema) de las orejas tratadas con TDF y con las ftálicas semi-sintéticas. Un evento celular clave durante la inflamación es la acumulación de PMN, los cuales involucran principalmente a los neutrófilos (Rao et al., 1993; Sacca et al., 1997; Saeed et al., 2012). La

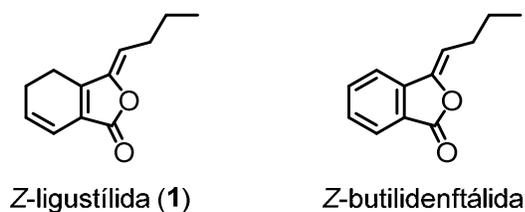
---

---

estimulación de los PMN, neutrófilos y monocitos, da lugar a la liberación de la enzima mieloperoxidasa y otras enzimas lisosomales (Klebanoff, 2005; Prokopowicz et al., 2012; Suzuki et al., 1983). La liberación de la enzima MPO puede contribuir a la patogénesis de la inflamación (Klebanoff, 2005). La enzima MPO se considera un marcador cuantitativo de infiltración celular en la piel, principalmente de los neutrófilos (Bradley et al., 1982; Laight et al., 1994; Saeed et al., 2012). El conteo de PMN permitió observar reducción en el reclutamiento de leucocitos, estos resultados obtenidos acerca del reclutamiento de leucocitos pueden tener relación con la reducción de la actividad de la enzima MPO que se registró en los grupos tratados con las ftálicas **11**, **12** y **8**; a enzima se encuentra también en los monocitos, pero de acuerdo a Bradley et al. (1982) la contribución de estos representa aproximadamente 0.06%, asumiendo con este dato que la mayor contribución pertenece a los neutrófilos. Sin embargo, el efecto antiinflamatorio observado en el ensayo de MPO no fue dosis-dependiente y esto puede deberse al tiempo de los ensayos; se sabe que el edema en el modelo de oreja de ratón inducido con TDF alcanza un máximo a las 6 h, pero la actividad de enzima MPO alcanza la actividad máxima a las 24 h y después disminuye lentamente (De Young et al., 1989; Gábor, 2002). Los productos naturales también inhibieron el edema, pero en una proporción menor. Algunos constituyentes naturales han sido previamente evaluados para probar su actividad antiinflamatoria en diversos modelos *in vitro*, observando buena actividad por parte de los productos naturales, Z-ligustílida (**1**) inhibe la producción del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (Chen et al., 2010), así como la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 (Chung et al., 2012), diligustílida (**2**) y toquinólida (**3**) inhiben la producción de óxido nítrico en la misma línea celular (Huang et al., 2013). La menor actividad observada por las ftálicas naturales en los modelos *in vivo* evaluados en este trabajo, con respecto a los resultados previamente reportados, podría deberse a la baja biodisponibilidad que presenta, particularmente la ftálica **1** y presumiblemente el resto de las ftálicas, ya que no hay evaluaciones al respecto de la biodisponibilidad de ninguna de las otras ftálicas evaluadas, a excepción de la ftálica **1** (Ding et al., 2008; Yan et al., 2008). Sekiya et al. (2000) administraron la Z-butílidenoftálica de manera tópica y observaron buena absorción de la ftálica a través de la piel. La Z-butílidenoftálica, es el compuesto aromático de la Z-ligustílida (**1**). De los constituyentes de *L. porteri* evaluados **1** es el más lipófilo, por lo que se esperaría que presentara un comportamiento similar a la Z-butílidenoftálica, que difundiera a través de la piel y que se favoreciera la actividad antiinflamatoria

---

del compuesto, sin embargo, se obtuvo una baja actividad antiinflamatoria para **1** y el resto de los dímeros, la diligustílida (**2**), la toquinólida B (**3**) y la riligustílida (**4**).



**Figura 34. Estructura de las ftálidas monoméricas Z-ligustílida y Z-butilidenftálida**

La carragenina inyectada en la pata trasera de ratas y ratones se emplea en modelos de inflamación y dolor inflamatorio (Nantel et al., 1999), es un polisacárido cuya reacción inflamatoria se evidencia a los 30 min de inyección (Souren et al., 2012). El efecto de la carragenina es bifásico: la primera fase (1-2 h) se encuentra mediada por la liberación de histamina, serotonina y cininas y la segunda fase (3-5 h) se encuentra mediada por la liberación de prostaglandinas (Niazi et al., 2010; Sulaiman et al., 2010). Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación indican una baja actividad antiinflamatoria en el modelo empleado, lo cual se evidenció por la poca disminución en el tamaño de la pata (edema) de los grupos tratados con carragenina y las ftálidas, este resultado es más evidente para las ftálidas **8** y **11**. Los resultados sugieren que las ftálidas **8**, **11** y **12** no suprimen la liberación de mediadores durante la primera fase de inflamación y solamente el producto de condensación de diligustílida (**12**) tiene efecto en la segunda fase del edema, a las 3 horas de evaluación el edema en la pata de los animales tratados con carragenina y la ftálida **12** disminuye, este compuesto tiene casi el mismo efecto que la indometacina (**Fig. 16**). En este modelo la actividad de la COX-2 se induce en la segunda fase de inflamación (Nantel et al., 1999; Payá et al., 1996). Las ftálidas semi-sintéticas mostraron baja actividad contra la inhibición de la actividad de ambas enzimas COX, este resultado podría relacionarse con la baja actividad observada en el modelo de carragenina, sin embargo no explicaría porque el compuesto **12**, el cual tiene actividad en el modelo de carragenina, no es el más activo inhibiendo a la COX-2. El mecanismo por el cual el compuesto **12** tiene actividad en el modelo de carragenina probablemente sea distinto a los que fueron evaluados en esta investigación. En el modelo de edema inducido con TDF la COX-2 tiene una inducción temprana (Lee et al., 2003) y de acuerdo a Rao y cols. (1993), en el modelo de TDF, los inhibidores de la COX administrados tópicamente, son más

---

efectivos para inhibir el edema. Si bien las ftálicas semi-sintéticas no presentaron actividad relevante inhibiendo la actividad de la COX, el efecto observado al inhibir a la enzima, así como el efecto observado al inhibir el reclutamiento de neutrófilos (y por consiguiente la actividad de la MPO) en conjunto podrían estar actuando al suprimir el edema.

Las ftálicas **8**, **11** y **12** también mostraron efecto en el modelo de línea celular de macrófagos estimulados con LPS, este modelo se emplea para evaluar la actividad de la SON (Dirsch et al., 1997). La medición del óxido nítrico resulta difícil debido a que su vida media es corta, la medición de la concentración de nitritos y nitratos es el método comúnmente usado para monitorear la concentración del NO (Guevara et al., 1998), con las ftálicas evaluadas se reduce la concentración de nitritos en el medio. La sobreproducción del óxido nítrico por la SON después de la estimulación con LPS o con citocinas pro-inflamatorias contribuye a la inflamación y causa permeabilidad vascular, activación de leucocitos e infiltración celular en el tejido inflamado (Lo Faro et al., 2014), la reducción en la producción de nitritos podría ser otro mecanismo mediante el cual las ftálicas actúan sobre la reducción en la infiltración de leucocitos, pero se necesita realizar otras evaluaciones *in vivo* al respecto. Sin embargo, las ftálicas afectaron la viabilidad celular conforme se incrementó la concentración de las mismas. Las ftálicas **11** y **12** mostraron, a ciertas concentraciones, reducción moderada en la viabilidad celular. La afectación sobre la viabilidad celular podría intervenir en el efecto sobre la reducción de la producción de nitritos causada por las ftálicas, debido a que se observa inhibición en la producción de nitritos no por efecto directo de las ftálicas, si no que al estar muriendo las células, también cesa la producción enzimática. Sin embargo, la ftálica **8** no mostró efecto tóxico contra las células, por lo tanto, el efecto observado sobre la producción de nitritos, aunque es bajo a ciertas concentraciones, se puede atribuir directamente a su actividad. En ese sentido cicloquinólida B (**8**) puede considerarse más prometedora que las otras dos ftálicas debido a que no es tóxica para las células de macrófagos.

La exploración de la actividad neuroprotectora contra isquemia cerebral también es tema relevante para la realización de este proyecto; el daño isquémico causado por trombosis, embolismo o hemorragia, da lugar a la afectación de un área del cerebro y esta no puede llevar a cabo sus funciones, y puede provocar incapacidad de movimiento de una o varias extremidades, o de visión de un lado del cuerpo, impedimento para formular y entender oraciones; los daños causados por un evento isquémico pueden causar complicaciones, ocasionar daños permanentes o causar la muerte

---

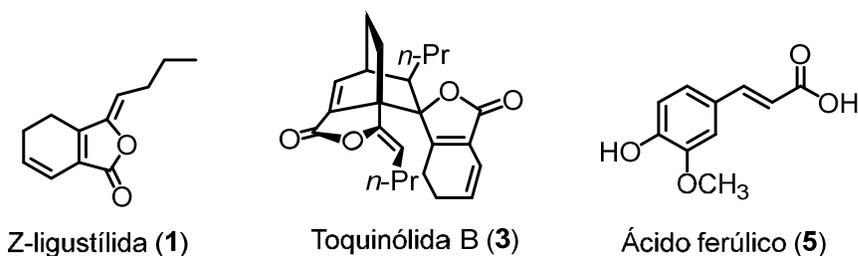
---

(Kikuchi et al., 2010). El único tratamiento efectivo probado contra la isquemia es la reperfusión con el trombolítico activador tisular del plasminógeno (tPA), sin embargo la ventana terapéutica reducida es la mayor limitante para su empleo, ya que si se excede éste tiempo para su aplicación incrementa la incidencia de hemorragia intracerebral y daño cerebral (Nakano et al., 2015); por lo tanto, de todos los pacientes que padecen un evento isquémico solamente al 3% se les administra tPA, el 97% restante recibe terapia no específica (Kikuchi et al., 2010). La edaravona o Radicut, es otro agente que en 2001 fue aprobado para uso clínico en Japón como agente neuroprotector (Isahaya et al., 2012; Kikuchi et al., 2010). La edaravona es un atrapador de radicales libres, e inhibe la peroxidación lipídica, y el daño a las células endoteliales vasculares (Tsukamoto et al., 2011), sin embargo, después de su administración puede agravar la falla renal aguda o el déficit renal en personas que presentan dichos padecimientos y puede causar daño hepático o desórdenes hematológicos (Pharmaceutical and Food Safety Bureau, 2007), la ausencia de terapias neuroprotectoras empleadas en la clínica crea la necesidad de explorar tratamientos que puedan ser aplicados en dicha área (Esmaeeli-Nadimi et al., 2015). La medicina tradicional de diversos países, particularmente de China, constituye una alternativa viable en el tratamiento de los accidentes cerebrovasculares, ya que existen diversas preparaciones entre las que se incluyen Buyang Huanwu, Xuefu Zhuyu, Taohong Siwu tang, Xiao Xu Ming, Shaofu Zhuyu (Yang et al., 2012) y FBD (Lin et al., 2009), para tal fin. Entre las plantas que se encuentran presentes en estas preparaciones, se encuentran la raíz de *Angelica sinensis* y la raíz de *Ligusticum chuanxiong*, todas las preparaciones han sido reportadas como formulaciones efectivas como neuroprotectoras contra isquemia cerebral. La planta *Ligusticum porteri*, con la cual se trabajó en el presente trabajo, pertenece a la misma familia que *Angelica* y *Ligusticum*, así mismo comparten los constituyentes principales. Sin embargo, las evaluaciones que realizamos de los constituyentes individuales indican incremento del daño por parte de algunos de estos, probablemente al emplear decocciones y preparaciones de la planta completa, la actividad positiva de los constituyentes, los cuales coinciden en ser los constituyentes mayoritarios, podría estar sobreponiéndose al efecto negativo de algunos de los constituyentes empleados de manera individual. Los productos naturales resultaron ser los más activos en el modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión al reducir la liberación de la enzima LDH. Bajo condiciones de déficit de energía, como ocurre durante la isquemia, la glicólisis es la fuente de energía y su principal producto es el lactato. El incremento en el lactato causa acidosis, la cual está relacionada con el daño a las membranas celulares, alteraciones en los

---

niveles de calcio intracelular, estrés oxidante y peroxidación de lípidos (Khalilov et al., 2014). El ácido ferúlico (**5**) ejerce efecto antioxidante durante la isquemia cerebral focal y controla los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducidos por la liberación de glutamato (Sung et al., 2012). Desde el punto de vista estructural, el compuesto **5** tiene grupos electro-donadores en el anillo del benceno, los cuales terminan las reacciones en cadena de los radicales libres. Además, el ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado puede ser otro sitio con capacidad para reaccionar con los radicales libres, evitando la peroxidación lipídica y el daño a la membrana celular (Itagaki et al., 2009). La capacidad antioxidante de este compuesto puede explicar parcialmente el efecto neuroprotector contra la muerte celular (liberación de LDH) y la consecuente protección del tejido estriatal.

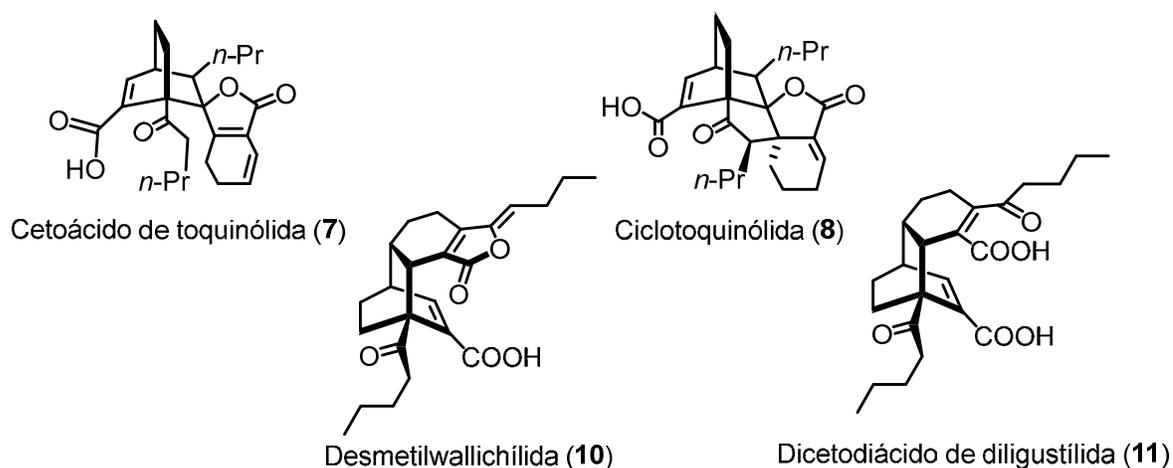
Z-ligustílida (**1**) disminuye la mortalidad en modelos *in vivo* de isquemia con reperfusión (Peng et al., 2013), en este proyecto de investigación se observó protección contra el daño celular en las rebanadas estriatales con 46.01% de disminución de la liberación de LDH; este efecto puede atribuirse a la actividad antioxidante de la ftálica, en un estudio previo en el cual se utilizó un modelo *in vitro* en líneas celulares, las cuales también fueron sometidas a condiciones de isquemia con reperfusión, se obtuvieron los mismos resultados que los obtenidos en este trabajo, en los cuales la administración de **1** inhibió la liberación de la enzima LDH (Wu et al., 2011). Como el ácido ferúlico (**5**), Z-ligustílida (**1**) puede atrapar radicales libres, ambos poseen sistemas conjugados en sus estructuras (Peng et al., 2013). El producto natural toquinólida B (**3**) también tiene actividad contra la liberación de LDH, sin embargo, mostró menor reducción en la inhibición de la liberación de LDH comparado con los dos productos naturales previamente mencionados. El compuesto **3** es un dímero de Z-ligustílida (**1**) y como **1**, tiene un sistema de conjugación-cruzada en su estructura, actuando también como un atrapador de radicales libres. Los productos naturales diligustílida (**2**) y riligustílida (**4**), los cuales también son dímeros de **1** incrementan la liberación de LDH.



**Figura 35. Productos naturales más activos en el modelo de liberación de LDH**

---

El cetoácido de toquinólida B (**7**) y ciclotoquinólida B (**8**) mostraron la mejor actividad neuroprotectora contra isquemia cerebral con reperfusión en el modelo *in vitro*, entre las ftálicas semi-sintéticas. Las diferencias estructurales entre **7** y **8** son la falta de un doble enlace y la formación de un anillo de 5 miembros en **8**. Desmetilwallichílida (**10**) y dicetodiácido de diligustílida (**11**) también inhibieron la liberación de LDH y quizás la apertura de una lactona, además de la formación de un grupo ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado en la molécula **10** favorecen la actividad inhibitoria de la liberación de la enzima LDH, lo cual también se observa para las ftálicas **7** y **8**. El efecto de las ftálicas **8**, **10** y **11** fue directamente proporcional a la concentración.



**Figura 36. Derivados semi-sintéticos más activos en el modelo de liberación de LDH**

Las ftálicas semi-sintéticas **9** y **12** incrementaron la liberación de LDH. Ambos compuestos tienen ésteres en sus estructuras, en lugar del grupo ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, lo cual pareciera que disminuye la protección de las rebanadas. La permeabilización y ruptura de la membrana es un proceso característico de células necróticas. La enzima LDH es una enzima citosólica, su presencia en el medio de cultivo se considera como un parámetro confiable para necrosis (Chan et al., 2013). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los compuestos naturales activos y las ftálicas semi-sintéticas tienen efecto neuroprotector contra muerte celular por necrosis en el modelo de isquemia con reperfusión empleado en este proyecto.

La inflamación también está relacionada con la muerte celular por necrosis (Davidovich et al., 2014; Fink and Cookson, 2005). Los patrones moleculares asociados a daño, son moléculas con propiedades de citocina, las cuales activan células del sistema inmune innato durante la necrosis,

---

la familia de IL-1, representa este tipo de moléculas, las cuales tienen propiedad para activar diversos tipos celulares tales como los macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y otros (Davidovich et al., 2014). Otras investigaciones han reportado que Z-ligustilida (**1**) inhibe la producción de IL-1 $\beta$  (Wang et al., 2010) y la toquinólida B (**3**), el cetoácido de toquinólida B (**7**), ciclotoquinólida B (**8**), desmetilwallichilida (**10**) y dicetodiácido de diligustilida (**11**) tienen actividad antiinflamatoria y **8** y **11** además son capaces de inhibir el reclutamiento de neutrófilos (Del-Ángel et al., 2015). La actividad antiinflamatoria de los compuestos seleccionados podría explicar parcialmente su habilidad para inhibir la liberación de LDH. Diligustilida (**2**) y riligustilida (**3**) también mostraron actividad antiinflamatoria en el modelo de edema empleado en este proyecto de investigación, sin embargo, esto no contribuyó de manera positiva a inhibir la liberación de LDH.

A pesar de que la liberación del contenido celular es una característica de las células necróticas, pueden ocurrir múltiples tipos de muerte en el tejido, pero la intensidad y duración del daño es determinante de cada tipo de mecanismo de muerte (Fink and Cookson, 2005). En isquemia, las células necróticas predominan. Sin embargo, la disminución del ATP también activa mecanismos de muerte celular apoptótica (Lo et al., 2003). La autofagia también ha sido implicada en la muerte celular inducida por isquemia, principalmente a través del establecimiento de excitotoxicidad (Ginet et al., 2009). Aunque el tiempo de exposición y las características fisiológicas del modelo de rebanadas isquémicas no representa el escenario típico de las condiciones naturales de neuronas estriatales, y los mecanismos de muerte celular apoptótica se encuentran involucrados, reportes previos sugieren que estos compuestos pueden intervenir también en la apoptosis y evitar la muerte celular en estudios *in vivo*. Un ejemplo de esto es que Z-ligustilida y el ácido ferúlico, los cuales inhiben la muerte por apoptosis en modelos de isquemia/reperfusión. Mientras que el ácido ferúlico contribuye a la inhibición de la caspasa-3 ejecutora y reduce la translocación de Bax del citosol a la mitocondria (Cheng et al., 2010), Z-ligustilida reduce la expresión de esas moléculas y también la expresión de Bcl-2 (Kuang et al., 2006).

En continuación con la secuencia de este proyecto, se evaluó uno de los compuestos en un modelo *in vivo* de isquemia con reperfusión en ratas. De acuerdo a los antecedentes de la literatura sobre el monómero Z-ligustilida (**1**), el cual se menciona como neuroprotector contra isquemia cerebral en diversas investigaciones (Kuang et al., 2006; Peng et al., 2013; Wu et al., 2011) y a los resultados obtenidos en este proyecto, principalmente tomando en consideración el efecto antiinflamatorio

---

que mostraron algunos de los constituyentes naturales y derivados semi-sintéticos, el compuesto de elección fue la ftálida semi-sintética dicetodiácido de diligustílida (**11**). Se esperaba que dicha ftálida protegiera del daño causado por isquemia, sin embargo, el compuesto **11** parece incrementar la lesión aunque el efecto no es significativo comparado al grupo tratado con el vehículo.

Los resultados histopatológicos indican que el compuesto no inhibe el edema en el tejido y por la progresión natural del daño isquémico es posible afirmar que tampoco protege la integridad de las membranas, ambos eventos se presentan durante la necrosis (Martin et al., 1998), estos resultados son contrarios a los resultados previamente obtenidos en el modelo *in vitro*, en el cual la ftálida **11** protegía del daño por necrosis, aunque el efecto no fue relevante en esta evaluación. La actividad de caspasa-3 incrementa a su vez el daño histopatológico observado, la ftálida promovió la actividad de dicha enzima a ambas horas a la cual fue evaluada, 24 y 72 y se presentó un incremento ligero a las 72 h, sin embargo, si la ftálida actúa sobre algún mediador de la vía apoptótica o el incremento en la actividad de la caspasa-3 es resultado final de la actividad del compuesto **11** sobre el daño global aún permanece desconocido.

El compuesto **11** también demostró incrementar la actividad de la enzima MPO en el modelo de isquemia con reperfusión *in vivo*, esta evaluación se había realizado previamente en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TDF. En esta evaluación dicetodiácido de diligustílida (**11**) inhibió de manera destacable la actividad de la enzima, así como el reclutamiento de neutrófilos (Del-Ángel et al., 2015). Es probable que esta diferencia en el resultado de las evaluaciones sea debido a la vía de administración, ya que en el edema en oreja, el compuesto fue administrado directamente en la zona de edema. Sin embargo, en el modelo de isquemia *in vivo* el compuesto fue administrado intraperitonealmente. Este comportamiento también se observó en el modelo de edema en la pata trasera, en dicho modelo las ftálidas también se administraron vía intraperitoneal, y en el cual el compuesto tampoco presentó actividad relevante contra el edema. Es probable que el dicetodiácido de diligustílida (**11**) presente metabolismo de primer paso, esto generaría probablemente otro tipo de compuestos que alcancen la circulación sistémica (Wang et al., 2015) y que exacerben el daño causado por la isquemia con reperfusión. Otra explicación pudiera ser que exista interacción de la ftálida **11** con algún componente celular y se estén generando otros metabolitos que sean dañinos y agraven el daño causado por el evento isquémico con reperfusión. No existen evaluaciones farmacocinéticas a la fecha para esta ftálida **11**. La ftálida monomérica Z-ligustílida (**1**) es la única de esta serie de compuestos a la que se le han realizado ensayos de

---

---

farmacocinética. En dicho estudio el compuesto **1** fue administrado entre otras vías, por la vía intraperitoneal, su biodisponibilidad fue de 52% y se presentaba efecto de primer paso. (Yan et al., 2008). Respecto al efecto dañino que parece ocasionar la administración de la ftálida **11** bajo las condiciones empleadas en este proyecto, pudiera ser que actúe sobre la ATPasa de sodio y potasio y sobre los niveles de calcio, causando desestabilización de la membrana celular y causando despolarizaciones peri-infarto, las cuales siguen propagando el daño del tejido (Hossmann, 2006), esto explicaría el incremento en el área de la lesión, el cual es mayor que el área de la lesión para el grupo de isquemia con reperfusión tratado con el vehículo. Otro factor que podría estar relacionado con el efecto observado, es la solubilidad del compuesto, el cual es poco soluble en soluciones no polares, se disuelve bien en metanol, etanol y DMSO. No obstante, en la evaluación *in vivo*, el compuesto fue administrado como suspensión, la cual disminuye su biodisponibilidad. Respecto a la mortalidad observada en los animales de evaluación, el hecho de que en los animales tratados con la ftálida **11** exista mortalidad a lo largo de todo el espectro de evaluación (2 h de isquemia-72 h de reperfusión) y en el grupo tratado con el vehículo, la mortalidad se presentó principalmente cercana a las 72 h, lo cual puede adjudicarse a la progresión normal del daño, podría estar indicando el posible efecto dañino del compuesto. Se requieren más evaluaciones al respecto y la exploración de la farmacocinética del compuesto para esclarecer algunos puntos previamente mencionados.



*Conclusiones*

---

## 8. Conclusiones

Algunas de las ftálicas semi-sintéticas tienen mejor actividad anti-inflamatoria que los productos naturales aislados de *Ligusticum porteri* y actúan modulando el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares y parece ser que la suma de los efectos, aunque bajos, sobre la actividad de la enzima ciclooxigenasa y sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico favorecen el efecto antiinflamatorio. En relación con la actividad neuroprotectora, el efecto fue mejor con los productos naturales. Puede afirmarse que algunos de los constituyentes de la planta *Ligusticum porteri* serían buenos candidatos a tener en consideración como agentes neuroprotectores, al igual que sería interesante ver el efecto que tiene la administración de dos o más de los constituyentes activos administrados concomitantemente; de igual manera para los derivados semi-sintéticos, los cuales podrían ser buenos candidatos como agentes antiinflamatorios de administración tópica. Indudablemente la solubilidad de los compuestos es un impedimento a tener en consideración, así como la falta de información sobre la farmacocinética de los compuestos.



*Referencias bibliográficas*

---

---

## 9. Referencias bibliográficas

- Appelt, G.D., 1985. Pharmacological aspects of selected herbs employed in Hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. *Ligusticum porteri* (osha) and *Matricaria chamomilla* (manzanilla). J. Ethnopharmacol. 13, 51-55.
- Argueta, V.A., Cano, A.L.M., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, D. F.  
[http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro\\_atlas.html](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html).
- Beck, J.J., Chou, S.C., 2007. The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. J. Nat. Prod. 70, 891-900.
- Beck, J.J., Stermitz, F.R., 1995. Addition of methyl thioglycolate and benzylamine to (Z)-ligustilide, a bioactive unsaturated lactone constituent of several herbal medicines. An improved synthesis of (Z)-ligustilide. J. Nat. Prod. 58, 1047-1055.
- Blobaum, A.L., Marnett, L.J., 2007. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. J. Med. Chem. 50, 1425-1441.
- Borutaite, V., Toleikis, A., Brown, G.C., 2013. In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia. FEBS J. 280, 4999-5014.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J. Invest. Dermatol. 78, 206-209.
- Brindis, F., Rodriguez, R., Bye, R., Gonzalez-Andrade, M., Mata, R., 2011. (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an alpha-glucosidase inhibitor. J. Nat. Prod. 74, 314-320.
- Butler, M.S., 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. Nat. Prod. Rep. 22, 162-195.
- Bye, R.A., 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and mexican market plants. Econ. Bot. 40, 103-124.
- Bye, R.A., Linares, E., 1986. Ethnobotanical notes from the Valley of San Luis, Colorado. J. Ethnobiol. 6, 289-306.
- Cégiéla-Carlio, P., 2005. Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. Flavour Frag. J. 20, 671-675.

- 
- 
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 3670-3695.
  - Craig, W.J., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 491S-499S.
  - Chan, F.K., Moriwaki, K., De Rosa, M.J., 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.* 979, 65-70.
  - Chandna, N., Kumar, S., Kaushik, P., Kaushik, D., Roy, S.K., Gupta, G.K., Jachak, S.M., Kapoor, J.K., Sharma, P.K., 2013. Synthesis of novel celecoxib analogues by bioisosteric replacement of sulfonamide as potent anti-inflammatory agents and cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 4581-4590.
  - Chen, Q.H., Li, P., Li, B., Yang, H.D., Li, X.L., Chen, F.C., 2010. A GC-MS-SIM Simultaneous Determination of Ligustilide and Butylidenephthalide from *Ligusticum chuanxiong* Using SFE. *Chromatographia* 72, 963-967.
  - Cheng, C.Y., Su, S.Y., Tang, N.Y., Ho, T.Y., Lo, W.Y., Hsieh, C.L., 2010. Ferulic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis by enhancing GABA(B1) receptor expression in transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 889-899.
  - Chung, J.W., Choi, R.J., Seo, E.K., Nam, J.W., Dong, M.S., Shin, E.M., Guo, L.Y., Kim, Y.S., 2012. Anti-inflammatory effects of (Z)-ligustilide through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB activation pathways. *Arch. Pharm. Res.* 35, 723-732.
  - Davidovich, P., Kearney, C.J., Martin, S.J., 2014. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol. Chem.* 395, 1163-1171.
  - De La Cruz, J.P., Villalobos, M.A., Cuerda, M.A., Guerrero, A., González-Correa, J.A., Sánchez De La Cuesta, F., 2002. Effects of S-adenosyl-L-methionine on lipid peroxidation and glutathione levels in rat brain slices exposed to reoxygenation after oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 318, 103-107.
  - De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 335-341.
  - Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castaneda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110, 334-342.

- 
- 
- Del-Ángel, M., Nieto, A., Ramírez-Apan, T., Delgado, G., 2015. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. *Eur. J. Pharmacol.* 752, 40-48.
  - Delgado, G., 1996. Natural products from some medicinal plants. Bioactivity and chemical reactivity. *Rev. Latinoamer. Quím.* 24, 37-43.
  - Delgado, G., Reza-Garduño, R.G., Rios, M.Y., Del Rio, F., 1992. Phthalides and Monoterpenes of the Hexane Extract of the Roots of *Ligusticum porteri*. *Planta Med.* 58, 570-571.
  - Deng, S., Chen, S.N., Lu, J., Wang, Z.J., Nikolic, D., van Breemen, R.B., Santarsiero, B.D., Mesecar, A., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Pauli, G.F., 2006. GABAergic phthalide dimers from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Phytochem. Anal.* 17, 398-405.
  - Díaz-Ruiz, A., Zavala, C., Montes, S., Ortiz-Plata, A., Salgado-Ceballos, H., Orozco-Suarez, S., Nava-Ruiz, C., Pérez-Neri, I., Pérez-Severiano, F., Rios, C., 2008. Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperfusion in rats. *J. Neurosci. Res.* 86, 3410-3419.
  - Ding, C., Sheng, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Du, G., 2008. Identification and comparison of metabolites after oral administration of essential oil of *Ligusticum chuanxiong* or its major constituent ligustilide in rats. *Planta Med* 74, 1684-1692.
  - Dirsch, V.M., Kiemer, A.K., Wagner, H., Vollmar, A.M., 1997. The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 336, 211-217.
  - Du, J., Bai, B., Kuang, X., Yu, Y., Wang, C., Ke, Y., Xu, Y., Tzang, A.H., Qian, Z.M., 2006. Ligustilide inhibits spontaneous and agonists- or K<sup>+</sup> depolarization-induced contraction of rat uterus. *J. Ethnopharmacol.* 108, 54-58.
  - Du, J., Yu, Y., Ke, Y., Wang, C., Zhu, L., Qian, Z.M., 2007. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. *J. Ethnopharmacol.* 112, 211-214.
  - Esmaeeli-Nadimi, A., Kennedy, D., Allahtavakoli, M., 2015. Opening the window: Ischemic postconditioning reduces the hyperemic response of delayed tissue plasminogen activator and extends its therapeutic time window in an embolic stroke model. *Eur. J. Pharmacol.* 764, 55-62.
  - Fang, L., Xiao, X.-F., Liu, C.-X., He, X., 2012. Recent advance in studies on *Angelica sinensis*. *CHM* 4, 12-25.

- 
- 
- Fietz, S., Bondzio, A., Moschos, A., Hertsch, B., Einspanier, R., 2008. Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases - an initial case study. *Res. Vet. Sci.* 84, 347-353.
  - Fink, S.L., Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907-1916.
  - Gábor, M., 2002. The mouse ear as a model for cutaneous irritation. *J. Toxicol.* 21, 191-202.
  - Gautam, R., Srivastava, A., Jachak, S.M., Saklani, A., 2010. Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1 inhibitory and antioxidant effects of *Dysophylla stellata* Benth. *Fitoterapia* 81, 45-49.
  - Ginet, V., Puyal, J., Clarke, P.G., Truttmann, A.C., 2009. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *Am. J. Pathol.* 175, 1962-1974.
  - Gorzalczany, S., Lopez, P., Acevedo, C., Ferraro, G., 2011. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. *J. Ethnopharmacol.* 133, 994-998.
  - Graff, G., Gamache, D.A., Brady, M.T., Spellman, J.M., Yanni, J.M., 1998. Improved myeloperoxidase assay for quantitation of neutrophil influx in a rat model of endotoxin-induced uveitis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 39, 169-178.
  - Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
  - Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A., 1998. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta.* 274, 177-188.
  - Guo, J., Duan, J.A., Shang, E.X., Tang, Y., Qian, D., 2009. Determination of ligustilide in rat brain after nasal administration of essential oil from *Rhizoma chuanxiong*. *Fitoterapia* 80, 168-172.
  - Halestrap, A.P., Kerr, P.M., Javadov, S., Woodfield, K.Y., 1998. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 79-94.

- 
- 
- Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., 2003. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 339-341.
  - Hawiger, J., 2001. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol. Res.* 23, 99-109.
  - Hossmann, K.A., 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 36, 557-565.
  - Hossmann, K.A., 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 1057-1083.
  - Huang, J., Lu, X.Q., Zhang, C., Lu, J., Li, G.Y., Lin, R.C., Wang, J.H., 2013. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Fitoterapia* 91, 21-27.
  - Iadecola, C., Anrather, J., 2011. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat. Neurosci.* 14, 1363-1368.
  - Isahaya, K., Yamada, K., Yamatoku, M., Sakurai, K., Takaishi, S., Kato, B., Hirayama, T., Hasegawa, Y., 2012. Effects of edaravone, a free radical scavenger, on serum levels of inflammatory biomarkers in acute brain infarction. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 21, 102-107.
  - Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K., 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.* 114, 466-471.
  - ITIS, 2015. *Ligusticum porteri* J.M. Coult. & Rose Taxonomy. Integrated Taxonomic Information System
  - Juárez-Reyes, K., Angeles-López, G.E., Rivero-Cruz, I., Bye, R., Mata, R., 2014. Antinociceptive activity of *Ligusticum porteri* preparations and compounds. *Pharm. Biol.* 52, 14-20.
  - Karmakar, R., Pahari, P., Mal, D., 2014. Phthalides and phthalans: synthetic methodologies and their applications in the total synthesis. *Chem. Rev.* 114, 6213-6284.
  - Khalilov, R.A., Dzhafarova, A.M., Dzhabrailova, R.N., Emirbekov, E.Z., 2014. Analysis of the kinetic characteristics of lactate dehydrogenase from the rat brain during ischemia and reperfusion. *Neurochem J.* 8, 265-270.
  - Kikuchi, K., Kawahara, K., Miyagi, N., Uchikado, H., Kuramoto, T., Morimoto, Y., Tancharoen, S., Miura, N., Takenouchi, K., Oyama, Y., Shrestha, B., Matsuda, F., Yoshida, Y.,

- 
- 
- Arimura, S., Mera, K., Tada, K., Yoshinaga, N., Maenosono, R., Ohno, Y., Hashiguchi, T., Maruyama, I., Shigemori, M., 2010. Edaravone: a new therapeutic approach for the treatment of acute stroke. *Med. Hypotheses* 75, 583-585.
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598-625.
  - Ko, W.C., Charng, C.Y., Sheu, J.R., Tzeng, S.H., Chen, C.M., 1998. Effect of butylidenephthalide on calcium mobilization in isolated rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1365-1369.
  - Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 4, 206-220.
  - Koh, P.O., 2012. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. *Neurosci. Lett.* 507, 156-160.
  - Kuang, X., Yao, Y., Du, J.R., Liu, Y.X., Wang, C.Y., Qian, Z.M., 2006. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Res.* 1102, 145-153.
  - Laight, D.W., Lad, N., Woodward, B., Waterfall, J.F., 1994. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* 292, 81-88.
  - Lee, J.L., Mukhtar, H., Bickers, D.R., Kopelovich, L., Athar, M., 2003. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192, 294-306.
  - Lee, J.M., Zipfel, G.J., Choi, D.W., 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, A7-14.
  - León, A., Toscano, R.A., Tortoriello, J., Delgado, G., 2011. Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri*; sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives. *Nat. Prod. Res.* 25, 1234-1242.
  - Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678-689.
  - Li, W., Tang, Y., Chen, Y., Duan, J.A., 2012. Advances in the chemical analysis and biological activities of chuanxiong. *Molecules* 17, 10614-10651.
  - Li, W., Zhang, S., Gao, Q.-H., Hou, J.-W., 2004. Different effects of ferulic acid and tetramethylpyrazine on the production of superoxide anion and nitric oxide in murine macrophages. *Res. Chem. Intermed.* 30, 605-613.

- 
- 
- Lin, G., Chan, S.S.K., Chung, H.S., Li, S.L., 2005. Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides *Studies in Natural Products Chemistry* 32, 611-669.
  - Lin, Z., Zhu, D., Yan, Y., Yu, B., 2009. Neuroprotection by herbal formula FBD and its active compounds. *Pharm. Biol.* 47, 608-614.
  - Linares, E., Bye, R.A., Jr., 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J. Ethnopharmacol.* 19, 153-183.
  - Liu, L., Ning, Z.Q., Shan, S., Zhang, K., Deng, T., Lu, X.P., Cheng, Y.Y., 2005. Phthalide Lactones from *Ligusticum chuanxiong* inhibit lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production and TNF-alpha-mediated NF-kappaB activation. *Planta Med* 71, 808-813.
  - Lo, E.H., Dalkara, T., Moskowitz, M.A., 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 399-415.
  - Lo Faro, M.L., Fox, B., Whatmore, J.L., Winyard, P.G., Whiteman, M., 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide-Biol. Ch.* 41, 38-47.
  - Lo, T.N., Almeida, A.P., Beaven, M.A., 1982. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 261-267.
  - Loetscher, H., Niederhauser, O., Kemp, J., Gill, R., 2001. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? *Drug. Discov. Today.* 6, 671-680.
  - Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R., 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84-91.
  - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
  - Lundberg, J.O., Weitzberg, E., 2010. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 39-45.
  - Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., Portera-Cailliau, C., 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 46, 281-309.
  - McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T., 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68, 2015-2022.

- 
- 
- Mehta, S.L., Manhas, N., Raghubir, R., 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.* 54, 34-66.
  - Miles, A.N., Knuckey, N.W., 1998. Apoptotic neuronal death following cerebral ischaemia. *J. Clin. Neurosci.* 5, 125-145.
  - Miyazawa, M., Tsukamoto, T., Anzai, J., Ishikawa, Y., 2004. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4401-4405.
  - Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., Kroemer, G., 2006. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.* 16, 264-272.
  - Mooney, E.H., Martin, A.A., Blessin, R.P., 2015. Effects of light environment on recovery from harvest and antibacterial properties of Oshá *Ligusticum porteri* (Apiaceae). *Econ. Bot.* 69, 72-82.
  - Moore, M., 2003. Medicinal Plants of the Mountain West. Museum of New Mexico Press, Santa Fe, 183-186.
  - Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
  - Nakano, T., Irie, K., Hayakawa, K., Sano, K., Nakamura, Y., Tanaka, M., Yamashita, Y., Satho, T., Fujioka, M., Muroi, C., Matsuo, K., Ishikura, H., Futagami, K., Mishima, K., 2015. Delayed treatment with ADAMTS13 ameliorates cerebral ischemic injury without hemorrhagic complication. *Brain Res.* 1624, 330-335.
  - Nakka, V.P., Gusain, A., Mehta, S.L., Raghubir, R., 2008. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol. Neurobiol.* 37, 7-38.
  - Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K.M., Chan, C.C., 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128, 853-859.
  - Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311-335.
  - Niazi, J., Gupta, V., Chakarborty, P., Kumar, P., 2010. Anti-inflammatory and antipyretic activity of *Aleuritis moluccana* leaves. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 3, 35-37.
  - Nielsen, J., 2002. Combinatorial synthesis of natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 297-305.

- 
- 
- Niyaz, M., Numakawa, T., Matsuki, Y., Kumamaru, E., Adachi, N., Kitazawa, H., Kunugi, H., Kudo, M., 2007. MCI-186 prevents brain tissue from neuronal damage in cerebral infarction through the activation of intracellular signaling. *J. Neurosci. Res.* 85, 2933-2942.
  - Oliva, I., Fernandez, M., Martin, E.D., 2013. Dopamine release regulation by astrocytes during cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 58, 231-241.
  - Or, T.C.T., Yang, C.L.H., Law, A.H.Y., Li, J.C.B., Lau, A.S.Y., 2011. Isolation and identification of anti-inflammatory constituents from *Ligusticum chuanxiong* and their underlying mechanism of action on microglia. *Neuropharmacology* 60, 823-831.
  - Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *Eur. J. Pharmacol.* 507, 253-259.
  - Paxinos, G., Watson, C., 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press., pp. 42, 104, 156.
  - Payá, M., Ferrándiz, M.L., Erradi, F., Terencio, M.C., Kijjoo, A., Pinto, M.M., Alcaraz, M.J., 1996. Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *Eur. J. Pharmacol.* 312, 97-105.
  - Peng, B., Zhao, P., Lu, Y.P., Chen, M.M., Sun, H., Wu, X.M., Zhu, L., 2013. Z-ligustilide activates the Nrf2/HO-1 pathway and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro*. *Brain Res.* 1520, 168-177.
  - Peng, H.Y., Du, J.R., Zhang, G.Y., Kuang, X., Liu, Y.X., Qian, Z.M., Wang, C.Y., 2007. Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 309-312.
  - Pharmaceutical and Food Safety Bureau, M.o.H., Labour and Welfare Japan, 2007. Pharmaceuticals and medical devices. Safety information, <http://pmda.go.jp/english/index.html>.
  - Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Garvi, J.M., Matias-Guiu, J., Roda, J.M., Barcia-Albacar, J.A., 2008. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev. Neurol.* 47, 414-426.
  - Prokopowicz, Z., Marcinkiewicz, J., Katz, D.R., Chain, B.M., 2012. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 60, 43-54.

- 
- 
- Qiao, M., Meng, S., Foniok, T., Tuor, U.I., 2009. Mild cerebral hypoxia-ischemia produces a sub-acute transient inflammatory response that is less selective and prolonged after a substantial insult. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 691-700.
  - Quiroz-García, B., 2004. Transformaciones de las ftálicas naturales diligustílida, toquinólida B y Z-ligustílida, Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., p. 110.
  - Quiroz-García, B., Hernández, L., Toscano, R.A., Sterner, O., Delgado, G., 2003. Base-catalyzed intramolecular condensation of tokinolide B. *Tetrahedron Lett.* 44, 2509-2512.
  - Radcliff, F.J., Fraser, J.D., Wilson, Z.E., Heapy, A.M., Robinson, J.E., Bryant, C.J., Flowers, C.L., Brimble, M.A., 2008. Anti-*Helicobacter pylori* activity of derivatives of the phthalide-containing antibacterial agents spiroloxine methyl ether, CJ-12,954, CJ-13,013, CJ-13,102, CJ-13,104, CJ-13,108 and CJ-13,015. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6179-6185.
  - Ran, X., Ma, L., Peng, C., Zhang, H., Qin, L.P., 2011. *Ligusticum chuanxiong* Hort: a review of chemistry and pharmacology. *Pharm. Biol.* 49, 1180-1189.
  - Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F., Isakson, P.C., 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 17, 723-741.
  - Recio, M.C., Giner, R.M., Uriburu, L., Máñez, S., Cerdá, M., De la Fuente, J.R., Ríos, J.L., 2000. *In vivo* activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.* 66, 2509-2518.
  - Rios, M.Y., Delgado, G., Espinosa-Pérez, G., 1998a. Base-catalyzed intramolecular condensation of diligustilide. *Tetrahedron Lett.* 39, 6605-6608.
  - Rios, M.Y., Delgado, G., Toscano, R.A., 1998b. Chemical reactivity of phthalides. Relay synthesis of diligustilide, *Rel'*-(3'*R*)-3',8'-dihydrodiligustilide and wallichilide. *Tetrahedron* 54, 3355-3366.
  - Sacca, R., Cuff, C.A., Ruddle, N.H., 1997. Mediators of inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 851-857.
  - Saeed, N.M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H.M., Algandaby, M.M., Al-Abbasi, F.A., Abdel-Naim, A.B., 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 84-93.

- 
- 
- Schinkovitz, A., Pro, S.M., Main, M., Chen, S.N., Jaki, B.U., Lankin, D.C., Pauli, G.F., 2008. Dynamic nature of the ligustilide complex. *J. Nat. Prod.* 71, 1604-1611.
  - Siegel, G., Wayne, R.A., Brady, S., Price, D., 2006. Basic Neurochemistry, in: Dugan, L.L., Kim-Han, J.S.K. (Eds.), *Hypoxic-Ischemic brain injury and oxidative stress* Seventh ed. Elsevier Academic Press, p. 564.
  - Souren, P.M., Shin, H.S., Kang, S.C., 2012. Inhibition of inflammations and macrophage activation by ginsenoside-Re isolated from Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Food Chem. Toxicol.* 50, 1354-1361.
  - Stoll, G., Kleinschnitz, C., Nieswandt, B., 2010. Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1207, 149-154.
  - Sulaiman, M.R., Perimal, E.K., Akhtar, M.N., Mohamad, A.S., Khalid, M.H., Tasrip, N.A., Mokhtar, F., Zakaria, Z.A., Lajis, N.H., Israf, D.A., 2010. Anti-inflammatory effect of zerumbone on acute and chronic inflammation models in mice. *Fitoterapia* 81, 855-858.
  - Sung, J.H., Kim, M.O., Koh, P.O., 2012. Ferulic acid attenuates the focal cerebral ischemic injury-induced decrease in parvalbumin expression. *Neurosci. Lett.* 516, 146-150.
  - Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345-352.
  - Terrell, B., Fennell, A., 2009. Oshá (bear root). *Nat. Plants* 10, 110-116.
  - Tripathi, R., Mohan, H., Kamat, J.P., 2007. Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chem.* 100.
  - Tsukamoto, Y., Takizawa, S., Takahashi, W., Mase, H., Miyachi, H., Miyata, T., Takagi, S., 2011. Effect of edaravone on the estimated glomerular filtration rate in patients with acute ischemic stroke and chronic kidney disease. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 20, 111-116.
  - Turi, C., Murch, S.J., 2011. The genus *Ligusticum* in North America. An ethnobotanical review with special emphasis upon species commercially known as "Oshá". *American Botanical Council* [www.herbalgram.org](http://www.herbalgram.org). 89, 40-51.
  - Virgili, M., Contestabile, A., Barnabei, O., 1995. Simultaneous blockade of non-NMDA ionotropic receptors and NMDA receptor-associated ionophore partially protects hippocampal slices from protein synthesis impairment due to simulated ischemia. *Hippocampus* 5, 91-97.

- 
- 
- Wang, J., Du, J.R., Wang, Y., Kuang, X., Wang, C.Y., 2010. Z-ligustilide attenuates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response via inhibiting NF-kappaB pathway in primary rat microglia. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 791-797.
  - Wang, Y., Ning, Z.H., Tai, H.W., Long, S., Qin, W.C., Su, L.M., Zhao, Y.H., 2015. Relationship between lethal toxicity in oral administration and injection to mice: effect of exposure routes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 205-212.
  - White, M., 1999. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 103, S378-381.
  - WHO, 2015. Top ten causes of death. World Health Organization.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
  - Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544-547.
  - Wu, X.M., Qian, Z.M., Zhu, L., Du, F., Yung, W.H., Gong, Q., Ke, Y., 2011. Neuroprotective effect of ligustilide against ischaemia-reperfusion injury via up-regulation of erythropoietin and down-regulation of RTP801. *Br. J. Pharmacol.* 164, 332-343.
  - Xia, W., Han, J., Huang, G., Ying, W., 2010. Inflammation in ischaemic brain injury: current advances and future perspectives. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 253-258.
  - Yan, R., Ko, N.L., Li, S.L., Tam, Y.K., Lin, G., 2008. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in *Rhizoma chuanxiong*, in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 36, 400-408.
  - Yang, C.L.H., Or, T.C.T., Lau, J.S.H., Lau, A.S.Y., 2012. *Ligusticum chuanxiong* and its decoctions: effects and underlying mechanisms of action on stroke. *Adv. Bot. Res.* 62, 315-341.
  - Zhang, L., Du, J.R., Wang, J., Yu, D.K., Chen, Y.S., He, Y., Wang, C.Y., 2009. Z-ligustilide extracted from *Radix Angelica Sinensis* decreased platelet aggregation induced by ADP *ex vivo* and arterio-venous shunt thrombosis *in vivo* in rats. *Yakugaku zasshi* 129, 855-859.
  - Zhu, X.H., Li, S.J., Hu, H.H., Sun, L.R., Das, M., Gao, T.M., 2010. Neuroprotective effects of Xiao-Xu-Ming decoction against ischemic neuronal injury *in vivo* and *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 127, 38-46.



*Artículo*



## Immunopharmacology and inflammation

## Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides



Mayela Del-Ángel, Antonio Nieto, Teresa Ramírez-Apan, Guillermo Delgado\*

Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México, D.F. México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 September 2014

Received in revised form

13 January 2015

Accepted 15 January 2015

Available online 23 January 2015

## Chemical compounds studied in this article:

Z-ligustilide (PubChem CID: 529865)

diligustilide (PubChem CID: 70698035)

tokinolide B (PubChem CID: 70681959)

## Keywords:

Inflammation

Semi-synthetic phthalides

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

Carrageenan

Myeloperoxidase

Oxide nitric synthase

## ABSTRACT

This study evaluated the potential anti-inflammatory effects of natural phthalides, isolated from *Ligusticum porteri*, and of semi-synthetic phthalides. Anti-inflammatory activity was investigated in two mouse models; one with ear edema, induced with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, and the other with paw edema, induced with carrageenan. The effect on the RAW 264.7 stimulated with lipopolysaccharide cells was evaluated and after application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, the activity of myeloperoxidase was assessed to serve as an index of leukocytes infiltration together with the histological evaluations. We also assessed the inhibition of cyclooxygenases 1 and 2 *in vitro*. Our results demonstrated that administration of semi-synthetic phthalides significantly inhibited the ear edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, and reduced the paw edema caused by carrageenan. The anti-inflammatory activity of phthalides could, in part, be explained by the reduction in myeloperoxidase activity and the infiltration of leukocytes. The semi-synthetic phthalides also inhibited the production of oxide nitric in RAW cells.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Inflammation is a response that link innate and adaptive immunity to soluble pro-inflammatory mediators as: leukotrienes, histamine, bradykinin, platelet activator factor, interleukins, and reactive oxygen species (Hawiger, 2001; Lo Faro et al., 2014). This response protects the body against infection and injury, but it can also produce deleterious consequences to the host (Gorzalczany et al., 2011; Hawiger, 2001). Neutrophils are infiltrating cells which represent the primary carriers of myeloperoxidase (MPO); thus, MPO is a biochemical marker of tissue neutrophil content (De Young et al., 1989; Laight et al., 1994; Lo et al., 1982). Other enzymes involved in inflammatory reactions include the cyclooxygenases (COXs), which produce prostaglandins (White, 1999), and the oxide nitric synthase (NOS). COX-1 is constitutively expressed; COX-2 is inducible by pro-inflammatory stimuli (Vane and Botting, 1998). The large amounts of oxide nitric produced by the NOS, mainly the inducible isoform, have shown to be harmful in the inflammatory process (Lo Faro et al., 2014). The inflammation is involved in various diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, among others (Souren et al., 2012). For that reason, the development of new anti-inflammatory agents is of interest.

Secondary metabolites from plants used in folk medicine constitute an important source for the search of new anti-inflammatory agents (Butler, 2005; Gorzalczany et al., 2011; Newman and Cragg, 2012; Payá et al., 1996; Souren et al., 2012).

*Ligusticum porteri* (Apiaceae) is a plant that grows in the northern Mexico and southern USA (Linares and Bye, 1987). This plant has been used traditionally by Rarámuri and Zuni communities for the treatment of bronchitis, stomachaches, and other ailments (León et al., 2011); root infusions have been applied topically to alleviate body aches (Linares and Bye, 1987). Several genera of the Apiaceae family produce phthalides (Beck and Chou, 2007). Natural phthalides isolated from the rhizome of *L. porteri* include Z-ligustilide (1), diligustilide (2), tokinolide B (3) and riligustilide (4) (Fig. 1). Several *in vitro* and *in vivo* studies have evaluated the anti-inflammatory effects of Z-ligustilide (1) (Chung et al., 2012; Liu et al., 2005; Wang et al., 2010; Zhaoji and Lunhao, 2012), diligustilide (2), and tokinolide B (3) (Huang et al., 2013). Other studies have investigated the chemical reactivities of some natural phthalides (Beck and Stermitz, 1995; Quiroz et al., 2003, 2004; Radcliff et al., 2008; Ríos et al., 1998a; 1998b). We previously reported the preparation of some semi-synthetic phthalides, including: ketoacid of tokinolide B (5), cyclotokinolide B (6), ketoester of tokinolide B (7), demethylwallichilide (8), diketodiacid of diligustilide (9) and an intramolecular condensation product (10) (Quiroz et al., 2003; Ríos et al. 1998a).

The present study was aimed to investigate the anti-inflammatory effects of natural and semi-synthetic phthalides (Fig. 1) in two mouse

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 44 45; fax: +52 55 56 16 22 17.

E-mail addresses: [mayela.delangelm@comunidad.unam.mx](mailto:mayela.delangelm@comunidad.unam.mx) (M. Del-Ángel), [delgado@unam.mx](mailto:delgado@unam.mx) (G. Delgado).

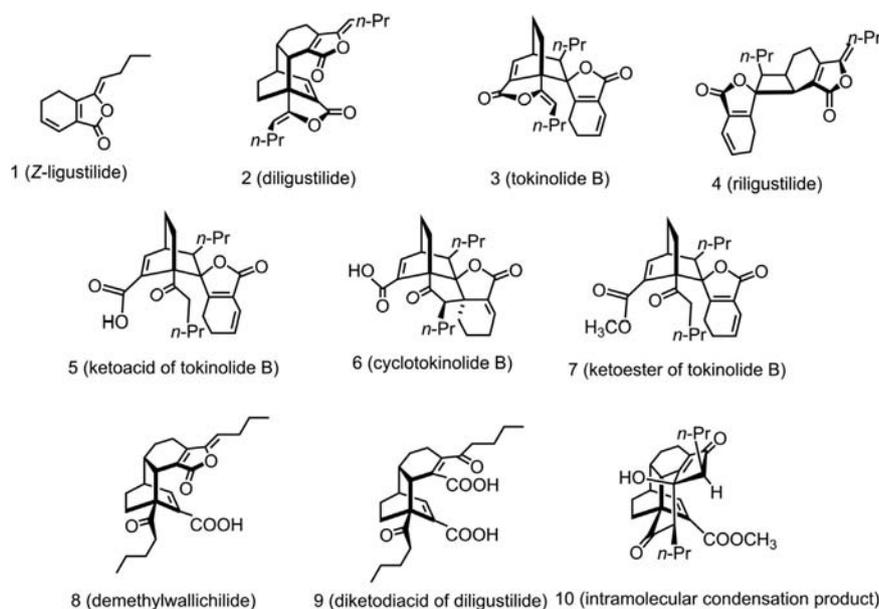


Fig. 1. Chemical structures of natural (1–4) and semi-synthetic phthalides (5–10).

models of inflammation. In one inflammation was induced by applying 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) to the ear. In the other model, edema was induced by injecting carrageenan into the hind paw. Furthermore, we evaluated the activities of MPO, COX-1, COX-2, and NOS.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of compounds

All natural compounds were isolated from the dried rhizomes of *L. porteri* according to procedures described previously. The acetone extract was separated by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, gradient, *n*-hexane/EtOAc) to afford *Z*-ligustilide (1), diligustilide (2), tokinolide B (3) and riligustilide (4). These structures were confirmed by spectroscopic analyses and by direct comparison with authentic samples isolated previously in our laboratory.

#### 2.1.1. Preparation of ketoacid of tokinolide B (5), cyclotokinolide B (6) and ketoester of tokinolide B (7)

Preparation of compounds 5–7 (Fig. 1) was carried out in accordance with the methodology described by Quiroz et al. (2003).

#### 2.1.2. Preparation of demethylwallichilide (8), diketodiacid of diligustilide (9) and the intramolecular condensation product (10).

Preparation of compounds 8–10 (Fig. 1) was carried out in accordance with the methodology described by Ríos et al. (1998a).

### 2.2. Experimental animals

Experiments were conducted with adult male CD-1 mice (25–30 g) purchased from the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, D. F. They were housed at 22 ± 2 °C under a 12 h light/12 h dark cycle, with access to food and water *ad libitum*. The mice were acclimatized for at least three days before testing and were used only once throughout the experiments. Experiments reported in this study were performed in accordance with the Mexican Official Regulations NOM-062-ZOO-1999.

#### 2.2.1. 12-*O*-tetradecanoylphorbol acetate induced mouse ear edema

The natural and semi-synthetic phthalides were evaluated for their anti-inflammatory effects on dermal inflammation. Mice were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of sodium pentobarbital (31.5 mg/kg, PISA). Each mouse received a topical application on the right ear of 10 μl ethanolic TPA (0.25 mg/ml; Sigma-Aldrich) solution to induce edema. 10 min later, the same ear received 1 μmol of a natural or semi-synthetic phthalide in 20 μl of methanol (vehicle). Mice were divided into 11 treatment groups of 4 mice each, including: 1) TPA alone (positive control), 2) *Z*-ligustilide (1)+TPA, 3) diligustilide (2)+TPA, 4) tokinolide B (3)+TPA, 5) riligustilide (4)+TPA, 6) ketoacid of tokinolide B (5)+TPA, 7) cyclotokinolide B (6)+TPA, 8) ketoester of tokinolide B (7)+TPA, 9) demethylwallichilide (8)+TPA, 10) diketodiacid of diligustilide (9)+TPA, 11) intramolecular condensation product (10)+TPA. The left ears (negative control) received only 10 μl of ethanol and 20 μl of methanol. After 4 h, animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber; then, disks of ear tissue (7 mm in diameter) were removed from each ear and weighed. The edema, which represented inflammation, was defined as the difference in weight between the disks from right (treated) and left (negative control) ears. The percentage of edema inhibition was calculated with the formula:

$$\% \text{ of inhibition} = [(C - E) / C] \times 100,$$

where

C = was the edema measured in the positive control group (TPA alone);

and

E = edema measured in the phthalide treatment group (Payá et al., 1996; Rao et al., 1993).

Phthalides that showed more than 50% inhibition of ear edema were selected for testing at different doses. The dose range was 0.031, 0.1, 0.31, 0.56, and 1 μmol in 20 μl of methanol (vehicle). Indomethacin (Sigma-Aldrich) was used as a reference anti-inflammatory drug. The treatment groups included 5–8 mice, and the same test procedure was repeated. A dose–response plot was analyzed with linear regression to determine the dose that provided 50% of inhibition (ID<sub>50</sub>).

#### 2.2.2. Carrageenan-induced hind paw edema in mice

The natural and semi-synthetic phthalides were evaluated for their anti-inflammatory effects on carrageenan-induced paw edema. Paw edema was induced with a subplantar injection of 0.05 ml 1% sterile lambda carrageenan in saline solution (0.9%) into the right hind paw.

Compounds that showed more than 50% inhibitory activity in the TPA model were tested in this model. Mice were divided into five treatment groups of 6 animals each as follows: 1) carrageenan alone (positive control; Type IV Sigma-Aldrich), 2) cyclotokinolide B (**6**) + carrageenan, 3) diketodiacid of diligustilide (**9**) + carrageenan, 4) intramolecular condensation product (**10**) + carrageenan, 5) indomethacin + carrageenan. Indomethacin was used as a reference anti-inflammatory drug (7.5 mg/kg, i.p.). The test groups received the semi-synthetic phthalides at doses of 50 mg/kg, i.p. The inflammation caused an increase in paw volume (edema). Volume displacement was measured in a plethysmometer (7140 Ugo Basile) at different times before and after the carrageenan injection. The degree of inflammation was defined as the difference in paw volumes measured before (time=0) and after (time=1, 3 and 6 h) the administration of carrageenan. The percentage of edema inhibition was calculated as follows:

$$\% \text{ of inhibition} = [(C - E)/C] \times 100,$$

where

C = edema measured at time = t in the positive control group (carrageenan only), and

E = edema measured at time = t in the groups that received phthalide (Winter et al., 1962).

### 2.2.3. Myeloperoxidase assay

We next evaluated MPO activity to determine whether the semi-synthetic phthalides affected neutrophil recruitment. TPA-treated ear samples were collected from mice that received semi-synthetic phthalides administered at 0.031, 0.1, 0.31, 0.56, and 1  $\mu\text{mol}$ . Samples comprised 7 mm ear tissue disks. Each disk was placed in a tube with 1 ml of 80 mM sodium phosphate buffer, pH 5.4, with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich). Samples were homogenized for 30 s at 0 °C in a homogenizer (OMNI International, model 125). The homogenate were freeze-thawed three times, then sonicated for 20 s. The samples were then centrifuged at 12000g at 4 °C for 10 min. The MPO assay was carried out with quadruplicate samples (10  $\mu\text{l}$  each), dispensed into microwell plates with sodium phosphate buffer (180  $\mu\text{l}$ , 80 M), pH 5.4, maintained at 37 °C. Hydrogen peroxide (20  $\mu\text{l}$ , 0.017%) was added to the well as substrate. The reaction was initiated with the addition of tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) (20  $\mu\text{l}$ , 18.4  $\mu\text{M}$ ) in a dimethylformamide (Sigma-Aldrich)

(50%) aqueous solution. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 5 min with slight agitation. The reaction was stopped with the addition of sulfuric acid (20  $\mu\text{l}$ , 2 M). Enzyme activity was determined colorimetrically, by measuring optical density (OD) at 450 nm. Activity is expressed as the OD/biopsy (Bradley et al., 1982; Recio et al., 2000; Susuki et al., 1983).

### 2.2.4. Histological analysis of skin tissue

Ear sections were fixed in a solution of 10% formaldehyde. The ears were subsequently embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin-eosin. The infiltration of leukocytes and ear thickness were evaluated in representative areas selected with 10 $\times$  and 40 $\times$  objectives. The quantification of leukocytes was performed by counting these cells per field; four fields from three distinct histological sections of each group were analyzed.

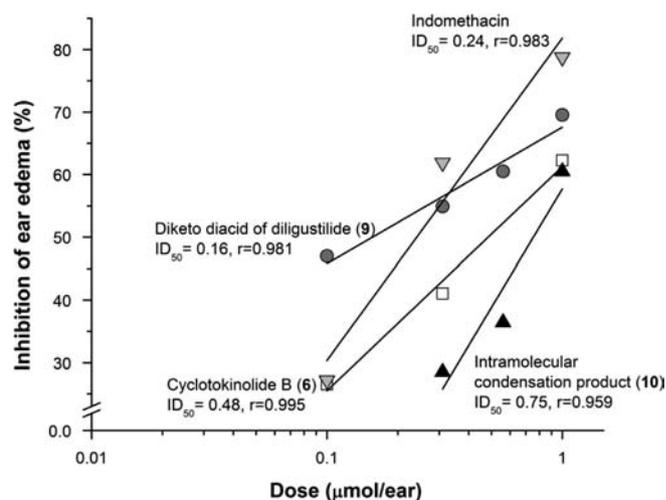


Fig. 3. Dose-response relationships for the semi-synthetic phthalides effects on inflammation induced by TPA. The effect of indomethacin (reference drug) is compared to effects of cyclotokinolide B (**6**), diketodiacid of diligustilide (**9**), and intramolecular condensation product (**10**). Results are expressed as the mean percentage of edema inhibition in five to eight animals; a linear regression analysis was used to calculate the dose that inhibited 50% of the edema ( $\text{ID}_{50}$ ).

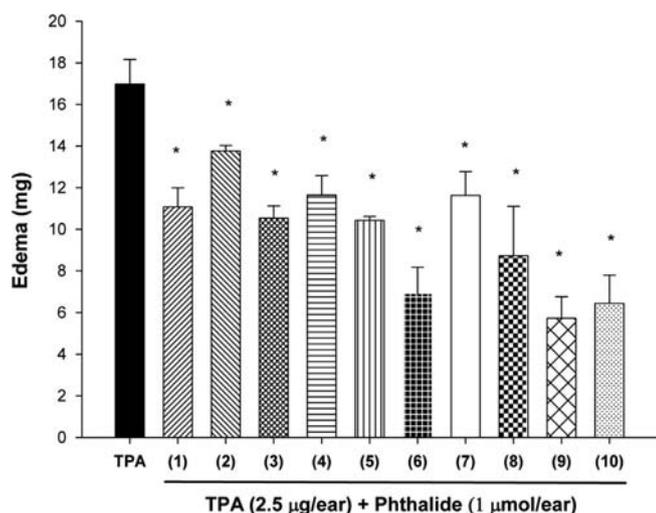


Fig. 2. Effect of the natural (compounds 1–4) and semi-synthetic (compounds 5–10) phthalides on ear edema induced in mice with the administration of 12-O-tetradecanoylphorbol acetate (TPA). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of four animals; compounds are designated as shown in Fig. 1. The edema (mg) was measured as the increase in weight between untreated ear tissue disks and TPA-treated ear tissue disks, where TPA was added alone or with the indicated phthalide. \* $P < 0.001$  vs TPA alone group, based on a one-way ANOVA followed by a Dunnett post-hoc test.

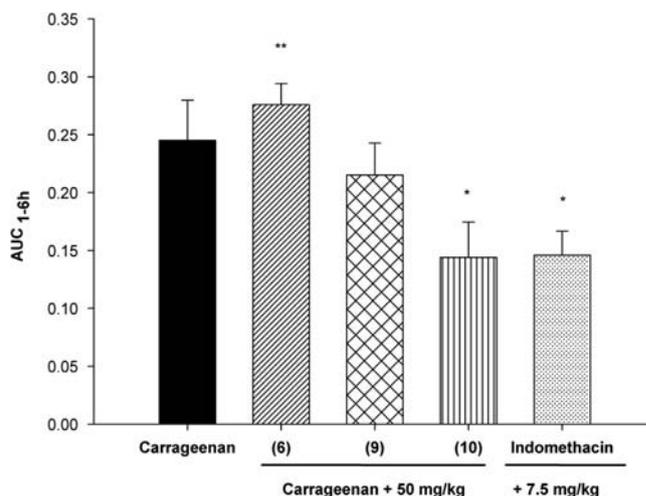


Fig. 4. Effects of the semi-synthetic phthalides on the carrageenan-induced mouse paw edema. The change in paw volume (ml) is expressed as the area under the curve (AUC) of paw volume measurements plotted against time (1–6 h), after the carrageenan injection. Compounds are designated as shown in Fig. 1. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of determinations in six animals. \* $P < 0.05$  vs carrageenan group, \*\* $P < 0.05$  vs indomethacin group, based on one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test.

### 2.3. *In vitro* COX-1 and COX-2 inhibition assay

To investigate whether semi-synthetic phthalides acted by the inhibiting COX activity, the compounds cyclotokinolide B (**6**), diketodiacid of diligustilide (**9**), and intramolecular condensation product (**10**) were screened in an enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Company, USA) according to the manufacturer's instructions. The semi-synthetic phthalides were evaluated at 30  $\mu$ M and 100  $\mu$ M, and the activities of COX-1 and COX-2 were measured. We used 30  $\mu$ M of either indomethacin (Sigma-Aldrich) or celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, as reference anti-inflammatory drugs, respectively (Chandna et al., 2013; Gautam et al., 2010).

### 2.4. *In vitro* nitrite assay

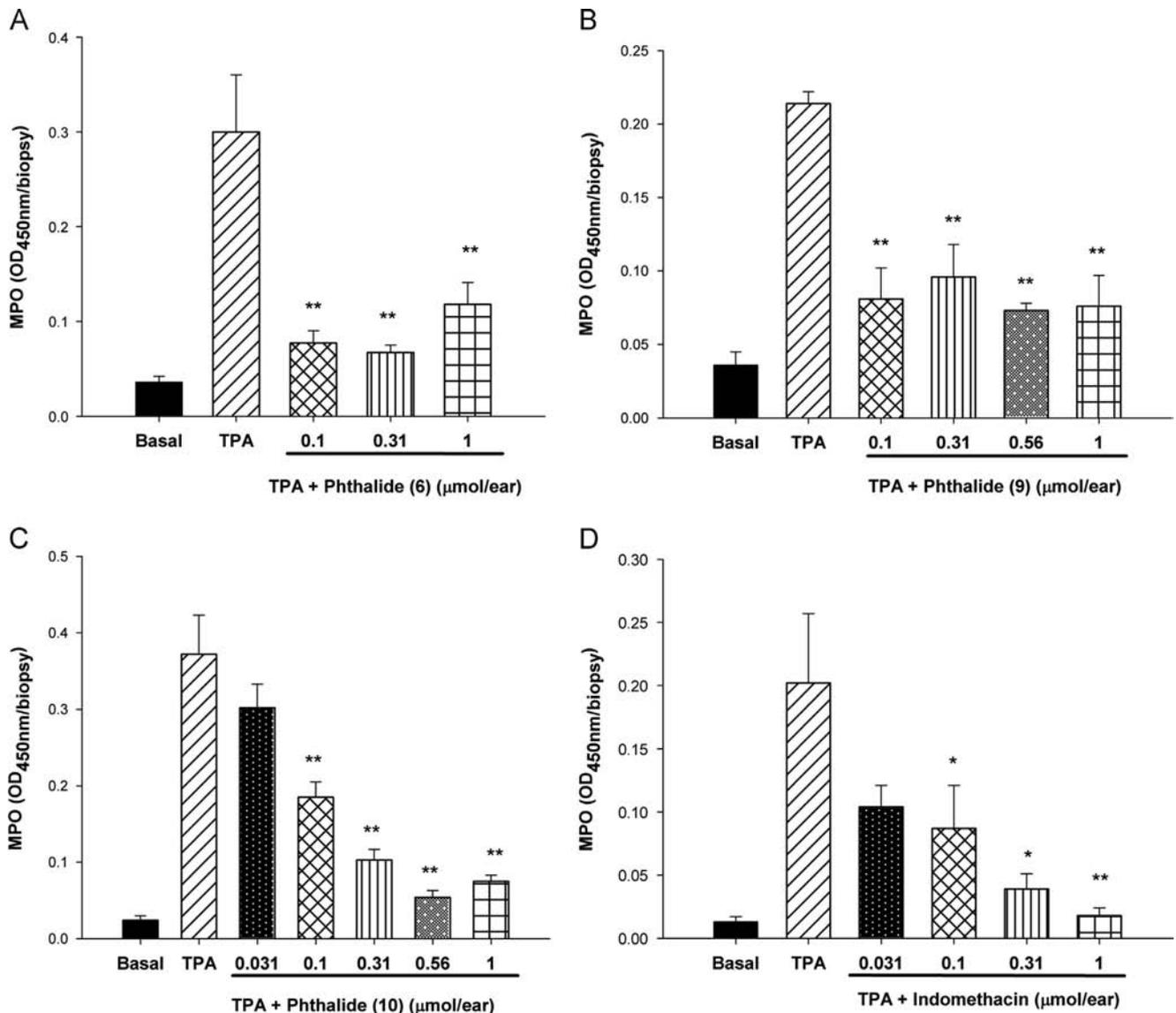
#### 2.4.1. Cell culture

RAW 264.7 cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71), were cultured in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) with 4 mM L-glutamine and 4.5 g/l glucose, 1 mM sodium pyruvate (ATCC 30–2002) supplemented with 10%

heat-inactivated fetal bovine serum (ATTC30-2020). Cells were maintained at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and used for experiments between passage 5 and 18. Cells were suspended in DMEM and viability was determined by Trypan blue exclusion. Phthalides cyclotokinolide B (**6**), diketodiacid of diligustilide (**9**), and intramolecular condensation product (**10**) were dissolved in DMSO, the final concentration in the cell culture supernatant was  $\leq$  0.1%. This concentration did not have any effect on the assays.

#### 2.4.2. Nitrite assay

For the assay 100  $\mu$ l/well of  $1 \times 10^6$  cells/ml were cultured in 96 well plates and incubated for 2 h. Cells were treated for 24 h at 37 °C, with or without lipopolysaccharide (*E. coli*, Serotype O55 B5, Sigma), 1  $\mu$ g/ml. In addition 50  $\mu$ l of each phthalide at concentrations range from 3.1 to 100  $\mu$ M was added to the respective wells. Aminoguanidine hydrochloride (Sigma) was used as a reference compound. The nitrite concentration in the medium was measured as an indicator of NO production according to the Griess reaction (Green et al., 1982). Supernatant (100  $\mu$ l) of each medium was mixed with the same volume of Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid



**Fig. 5.** Dose–response plots of semi-synthetic phthalides on myeloperoxidase (MPO) activity. Mouse ear tissues were untreated (basal) or treated with TPA, then treated with the indicated doses of phthalides: (A) cyclotokinolide B (**6**); (B) diketodiacid of diligustilide (**9**); (C) intramolecular condensation product (**10**); and (D) indomethacin. MPO activity was measured colorimetrically (OD<sub>450</sub>) in ear edema homogenates. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the MPO activity determined in five to eight animals. \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$  vs TPA alone (positive control group), based on one-way ANOVA followed by the Dunnett post-hoc test.

and 0.1% N-(*n*-naphtyl)-ethylene-diamine dihydrochloride in water). Absorbance of the mixture was determined at 515 nm with ELISA plate reader (Syner/HT Biotek Instruments). Concentration of nitrites ( $\mu\text{M}$ ) was determined using a standard curve of  $\text{NaNO}_2$ . Experiments were performed three times in triplicated.

#### 2.4.3. Cell viability

Cell respiration was used as an indicator of cell viability, and was determined by the mitochondrial dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to formazan (Mosmann, 1983). Briefly, 10  $\mu\text{l}$  of MTT was added to remaining cell in 96 well plates and incubated for 4 h at 37 °C. Incorporated dye was dissolved in DMSO (100  $\mu\text{l}$ ). Absorbances were measured at 570 nm. Results are expressed as percentage of MTT incorporated into treated cells compared with control cells.

#### 2.5. Statistical analysis

Multiple comparisons were performed with one-way analyses of variance (ANOVA) followed by the Dunnett post-hoc test, only for the evaluation of oxide nitric the Tukey post-hoc test was used. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. A *P*-value  $\leq 0.05$  or  $\leq 0.001$  was used as the criterion of significance.

### 3. Results

#### 3.1. 12-*O*-tetradecanoylphorbol acetate-induced mouse ear edema

The semi-synthetic phthalides possessed anti-inflammatory activity in the TPA model. Diketodiacid of diligustilide (**9**) had the best inhibitory effect. TPA application caused a massive increase in the ear tissue weight. Treatment with the semi-synthetic phthalides (1  $\mu\text{mol/ear}$ ) significantly reduced ear tissue weight, but the percentage of inhibition was variable among different compounds. Inhibition was highest with diketodiacid of diligustilide (**9**) (66.00%), followed by intramolecular condensation product (**10**) (62.00%), cyclotokinolide B (**6**) (59.00%), demethylwallchilide (**8**) (48.55%), ketoacid of tokinolide B (**5**) (38.59%), and ketoester of tokinolide B (**7**) (31.52%). The natural phthalides (compounds **1–4**, Fig. 1) showed less inhibition of ear edema (Fig. 2).

In the TPA model, inflammation was reduced by diketodiacid of diligustilide (**9**) with a lower  $\text{ID}_{50}$  than that of indomethacin; conversely, cyclotokinolide B (**6**) showed an  $\text{ID}_{50}$  twice as large as that of indomethacin (Fig. 3).

#### 3.2. Carrageenan-induced hind paw edema in mice

Injection of carrageenan into the mouse paw caused a gradual increase in hind paw volume. Pre-treatment with intramolecular condensation product (**10**) inhibited the carrageenan-induced mice paw edema by 47.92% at 3 h. Indomethacin displayed 58.33% of inhibition over the same time. Diketodiacid of diligustilide (**9**) did not show a significant effect, and cyclotokinolide B (**6**) seemed to show a pro-inflammatory reaction in this test. The areas under the curves (AUCs) were nearly the same for indomethacin and the intramolecular condensation product (**10**), and both were significantly smaller than AUC for the carrageenan group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4).

#### 3.3. Myeloperoxidase assay

To determine whether phthalides affected neutrophil recruitment, we determined the enzymatic activity of MPO in ear tissues after TPA treatment, followed by different concentrations of the phthalides. The results for cyclotokinolide B (**6**), diketodiacid of diligustilide (**9**), intramolecular condensation product (**10**) and

indomethacin showed significant reductions in MPO activity at different concentrations. The best inhibitory effects were observed at the following concentrations: cyclotokinolide B (**6**, 77.6% at 0.31  $\mu\text{mol}$ ), diketodiacid of diligustilide (**9**, 65.88% at 0.56  $\mu\text{mol}$ ), intramolecular condensation product (**10**, 85.48% at 0.56  $\mu\text{mol}$ ), and indomethacin (91.09% at 1  $\mu\text{mol}$ ) (Fig. 5A–C). In addition, the activity of MPO was tested in paw tissues, but the semi-synthetic phthalides did not display activity in this model (data not shown).

#### 3.4. Histological analysis of skin tissue

Fig. 7 shows the analysis of ear sections stained with hematoxylin-eosin. Administration of TPA increases the edema, the ear thickness (Fig. 6), and the cell infiltration like polymorphonuclear and mononuclear leukocytes (Figs. 6, 7B, and G). Treatment with the phthalides considerably reduced harmful effects of TPA (Fig. 7C–E) (similar to the effect previously noted for a natural acylglucosylsterol (Hernández-Valle et al., 2014)) and the effects are similar to indomethacin (Fig. 6, Fig. 7F). The analysis showed that phthalides (**6**) and (**10**) had better effect than phthalide (**9**) on the leukocyte infiltration.

#### 3.5. *In vitro* inhibition assay for cyclooxygenases-1 and 2

The semi-synthetic phthalides did not show selective activity against either COX-1 or COX-2 enzymes. Inhibition of COX-1 was greatest with concentrations of 30 and 100  $\mu\text{M}$  of diketodiacid of diligustilide (**9**) (24.92% and 30.72% inhibition, respectively), or intramolecular condensation product (**10**) (27.82% and 30.32%, respectively). Indomethacin (the reference drug) showed 78.23% inhibition. Inhibition of COX-2 was greatest with the diketodiacid of diligustilide (**9**) at the same two concentrations (29.51% at 30  $\mu\text{M}$ , and 37.54% at 100  $\mu\text{M}$ ). The reference drug, celecoxib, showed 81.34% inhibition. Thus, the phthalides were significantly less effective than the two reference drugs evaluated (Fig. 8).

#### 3.6. *In vitro* nitrite assay

The semi-synthetic phthalides (cyclotokinolide B (**6**), diketodiacid of diligustilide (**9**); and intramolecular condensation product

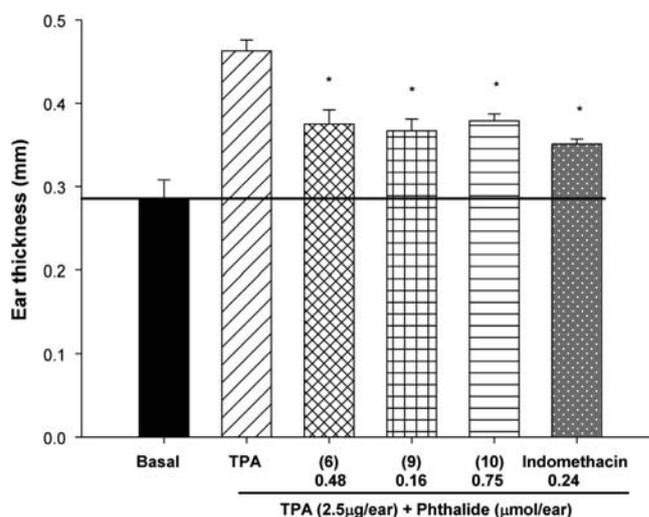
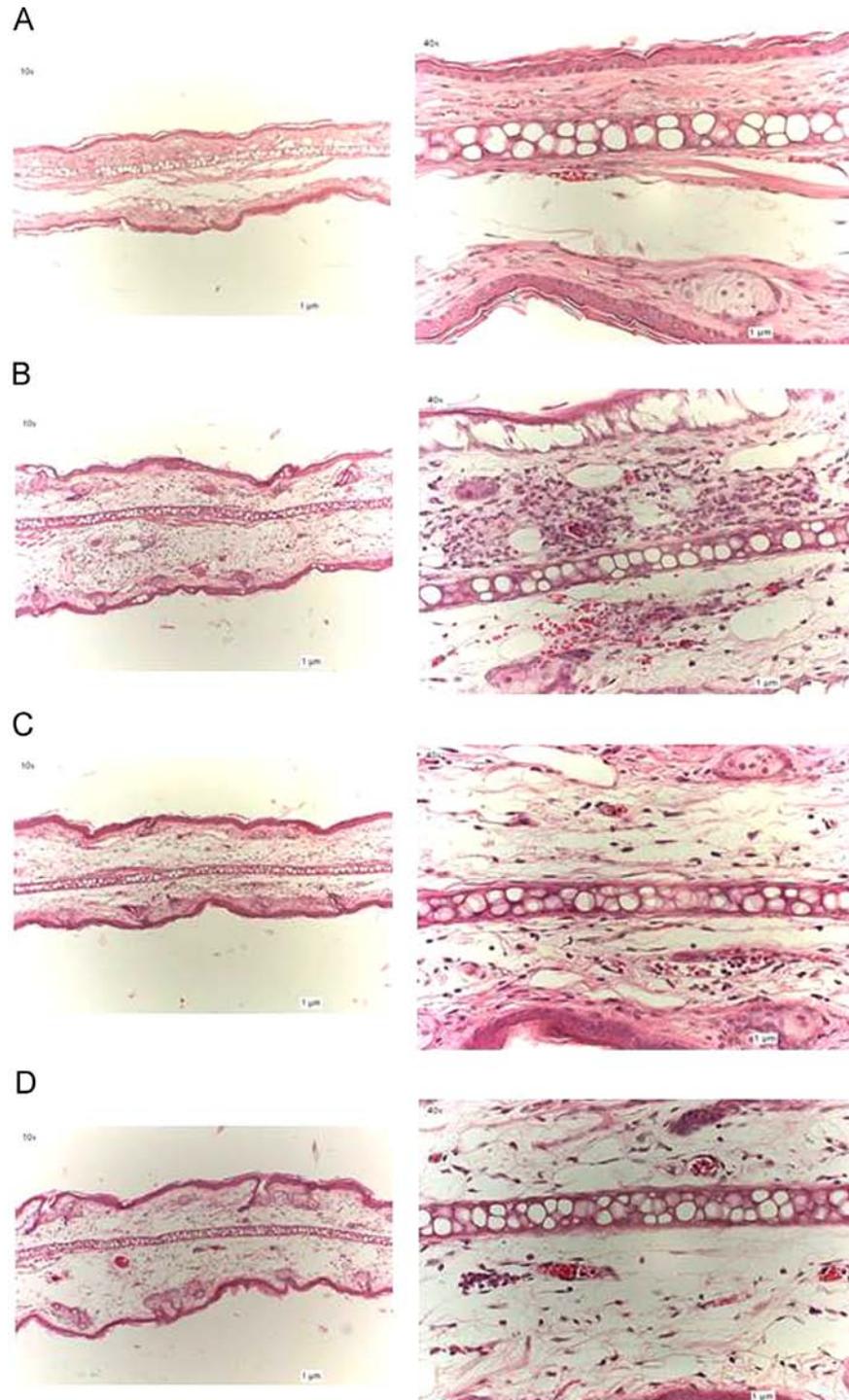


Fig. 6. Effect of the semi-synthetic phthalides (cyclotokinolide B (**6**), diketodiacid of diligustilide (**9**), intramolecular condensation product (**10**), and indomethacin) on ear thickness in mice following the administration of 12-*O*-tetradecanoylphorbol acetate (TPA). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of four animals. \* $P \leq 0.05$  vs TPA alone group, based on a one-way ANOVA followed by a Dunnett post-hoc test.

(10) showed effect on the inhibition of the production of nitrites (Fig. 9). The effect of the phthalides is concentration-dependent and is better for the diketodiacid of diligustilide (9); and intramolecular condensation product (10) both at 100  $\mu$ M, the percentages of inhibition of nitrites are 74.3% and 98.2% respectively and the effect is better than the aminoguanidine, the reference compound. However, the viability diminishes at that concentration for both phthalides, 60.3% and 54.8%, respectively. Cyclotokinolide B (6) showed the lowest effect on the inhibition of the production of nitrites and almost did not affect the cell viability.

#### 4. Discussion

*Ligusticum porteri* is considered one of the most important herbal remedies used traditionally for the communities in northern Mexico and southern USA. Previously, purified phthalides from this plant have exhibited different bioactivities. For example, Z-ligustilide (1) was reported to be active in asthma and inflammation, among others disorders (Beck and Chou, 2007). Therefore, we designed the present study to investigate the anti-inflammatory activity of natural and semi-synthetic phthalides in three biological models, TPA and carrageenan



**Fig. 7.** Histopathological analysis of sections from mice ears administrated with TPA stained with hematoxylin-eosine (10  $\times$ , left, 40  $\times$ , right, scale 1  $\mu$ m), and quantification of leukocytes (G). (A) Basal, (B) TPA, (C) cyclotokinolide B (6), (D) diketodiacid of diligustilide (9), (E) intramolecular condensation product (10), and (F) indomethacin. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three sections. \* $P$  < 0.05 vs TPA group, based on a one-way ANOVA followed by a Dunnett post-hoc test.

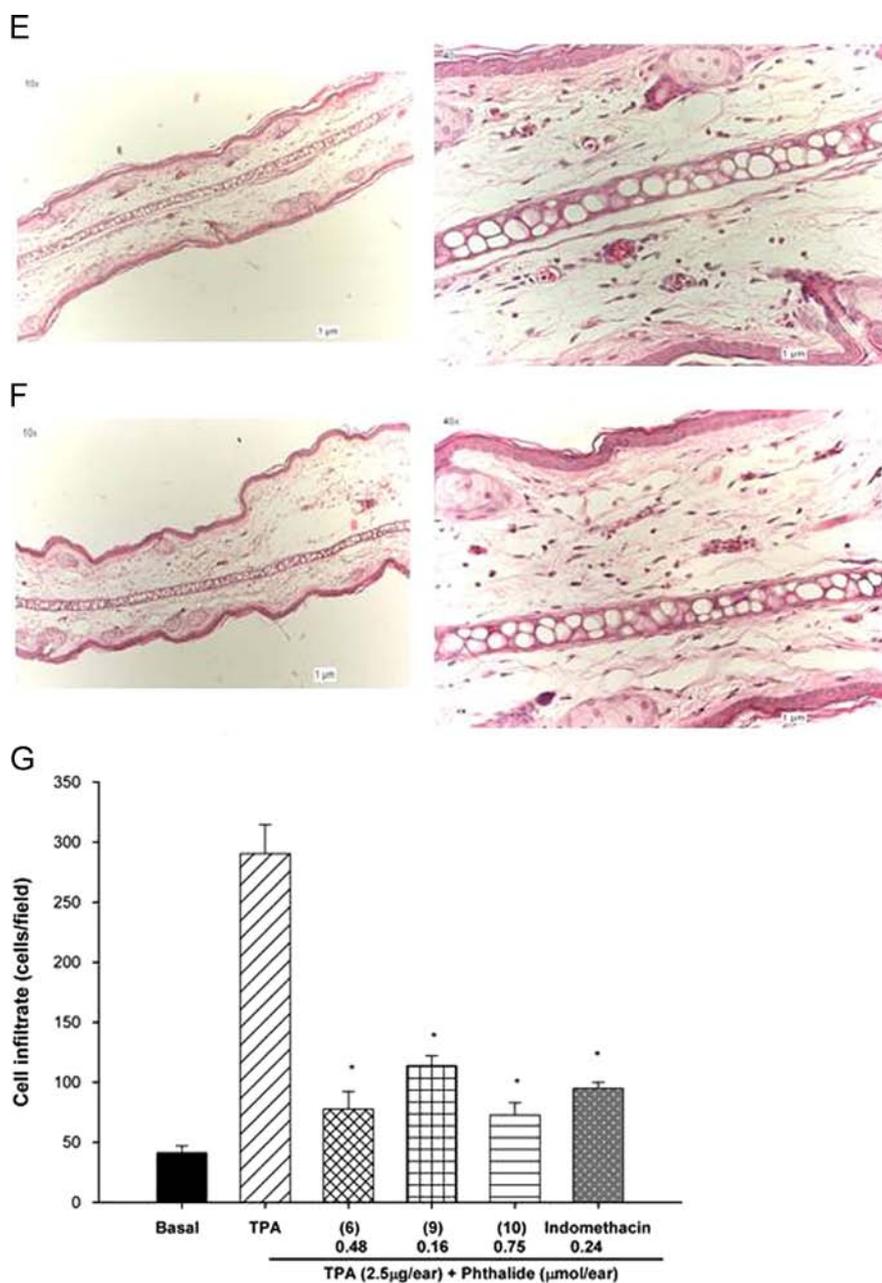
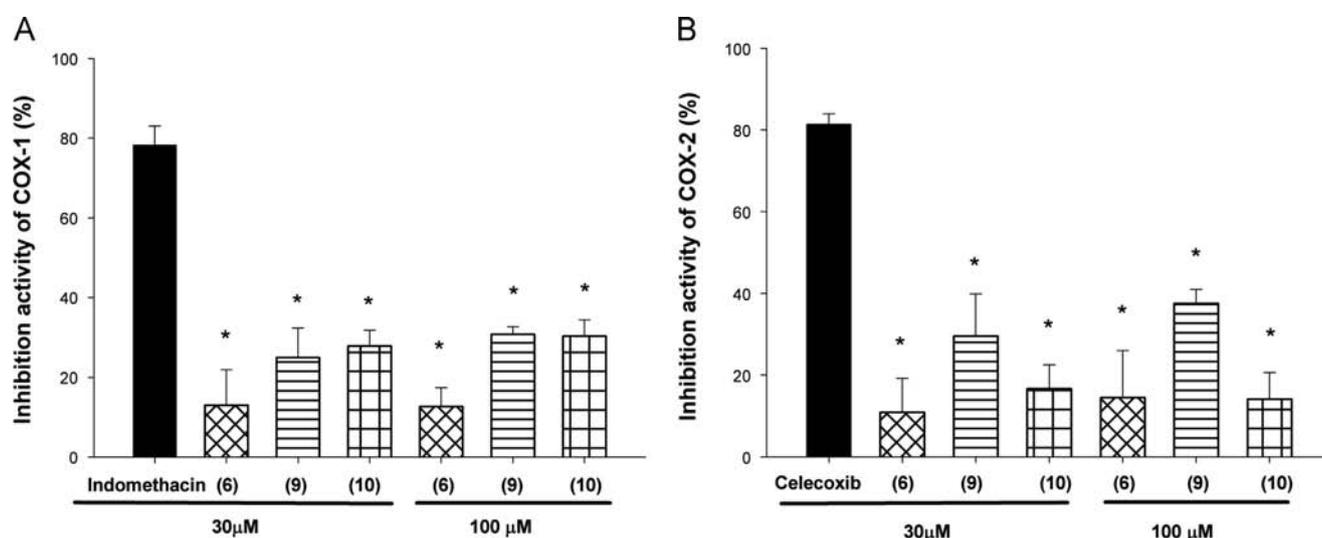


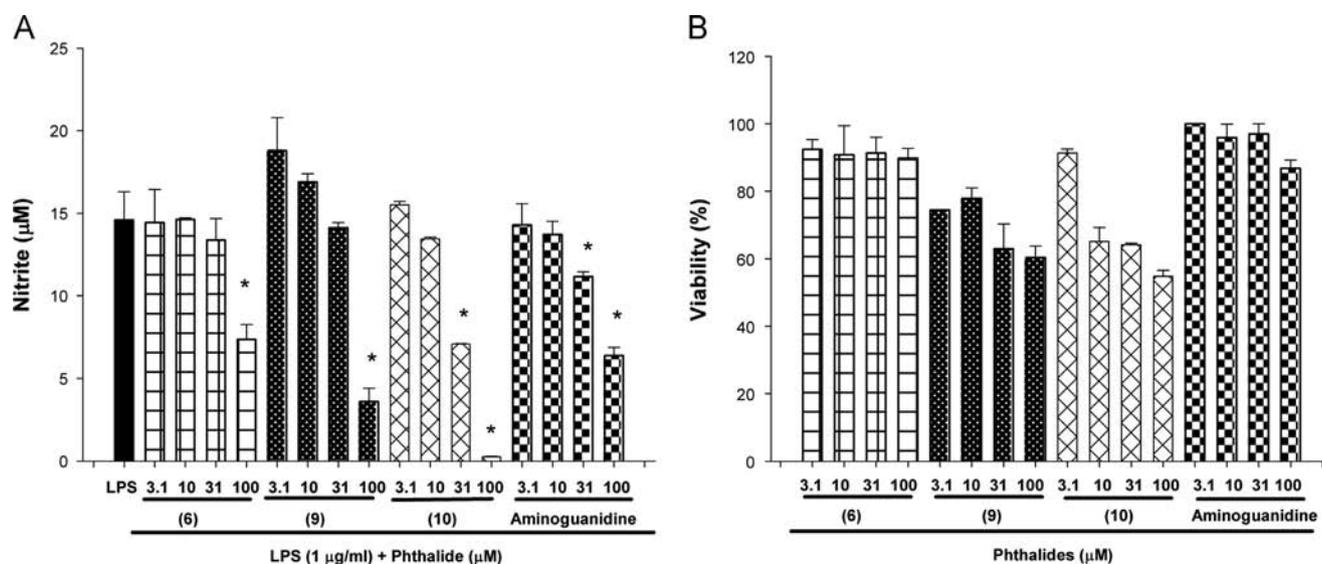
Fig. 7. (continued)

induced edema in mice and on RAW 264.7 cells. TPA has been associated with the influx of neutrophils and mononuclear cells, accompanied by early induction of COX-2 (Lee et al., 2003). Our results indicated that three semi-synthetic compounds, diketodiacid of diligustilide (9), intramolecular condensation product (10) and cyclotkinolide B (6) exhibited significant anti-inflammatory activity in ear edema. At a dose of 1 μmol/ear, these three compounds exhibited local anti-inflammatory effects by significantly reducing ear punch weight. A key cellular event in inflammation is the accumulation of polymorphonuclear leukocytes (PMN), which primarily comprise neutrophils (Rao et al., 1993; Sacca et al., 1997; Saeed et al., 2012). PMN stimulation, neutrophils and monocytes, lead to cellular release of MPO and other lysosomal enzymes (Klebanoff, 2005; Susuki et al., 1983; Prokopowicz et al., 2012). This release can contribute to the pathogenesis of inflammation (Klebanoff, 2005). MPO is considered a quantitative marker for cell infiltration in skin, mainly neutrophils, (Bradley et al., 1982; Laight et al., 1994; Saeed et al., 2012). The histological

examination let us confirm the significant reduction in the thickness of ears treated with TPA and the semi-synthetic phthalides, and the reduction in the leukocyte recruitment; we could correlate the result obtained from the recruitment of leukocytes, with the activity of the MPO enzyme, the MPO is found also in monocytes but according to Bradley et al. (1982) the contribution of this represents approximately 0.06%. Nevertheless, the anti-inflammatory effect observed on MPO assay was not dose-dependent, and this may be due to the timing of the assay. It is known that edema on the TPA model reaches a maximum at 6 h, but MPO activity reaches maximum activity at 24 h, and then slowly decreases (De Young et al., 1989; Gábor, 2002). The effect of carrageenan is believed to be biphasic: in the first phase (1–2 h), it mediates the release of histamine or serotonin, and in the second phase (3–5 h) it mediates the release of kinins and prostaglandins (Niazi et al., 2010; Sulaiman et al., 2010). Our results suggested that the phthalide compounds did not suppress the release of mediators during the first phase of inflammation (including serotonin and



**Fig. 8.** Effects of semi-synthetic phthalides on cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1 and COX-2) activities. Semi-synthetic phthalides were applied at the indicated concentrations, and (A) COX-1 and (B) COX-2 activities were measured *in vitro* with an enzyme immunoassay. Compounds are designated as shown in Fig. 1. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of four determinations. (A) \* $P \leq 0.01$  vs indomethacin; (B) \* $P \leq 0.05$  vs celecoxib treatment, based on a one-way ANOVA followed by a Dunnett post-hoc test.



**Fig. 9.** Concentration-dependent effect of the semi synthetic phthalides on: (A) the inhibition of nitrite accumulation in the cell culture supernatants of RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and (B) the cell viability. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three determinations by triplicate. (A) \* $P < 0.05$  vs lipopolysaccharide treatment, based on a one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test.

bradykinin), and only the intramolecular condensation product (**10**) had effect on the second phase of edema; at 3 h (data not shown); the intramolecular condensation product (**10**) had almost the same effect as indomethacin (also see the AUC values in Fig. 4). In this model, COX-2 activity is induced in the second phase of inflammation (Nantel et al., 1999; Payá et al., 1996). Our *in vitro* results indicated that the semi-synthetic phthalides showed low activity against pure COX enzymes, and these results could correlate with the observed low activity in the carrageenan model. The semi-synthetic phthalides also had effect on the model of macrophages cell line RAW 264.7 stimulated with lipopolysaccharide, which is a model for the system of inducible nitric oxide synthase (Dirsch et al., 1997). The reaction of nitric oxide with oxygen leads to nitrite (Moorcroft et al., 2001). The phthalides reduce this production. The over production of oxide nitric by the inducible oxide nitric synthase after the stimulation with lipopolysaccharide or pro-inflammatory cytokines is believed to contribute to inflammation by causing vascular permeability, leukocyte activation, and infiltration to the inflamed tissue (Lo Faro et al., 2014), the phthalides could act through the reduction of the production of nitrites in the reduction of

the leukocyte infiltration, but further evaluations *in vivo* at respect are necessary. Phthalides showed affect the viability of the cells at increasing the concentration. Phthalides **9** and **10** showed moderate reduction in the cellular viability (20–40%), this reduction is concentration-dependent. The inhibition in the production of nitric oxide could be attributed in part to the reduction in the cellular viability and in other way to the real effect of the phthalide. However, phthalide **6** did not show toxic effect against the cells, therefore, the observed effect over the production of nitrites, even low, is attributed to the activity of phthalide **6**. In that way, cyclotokinolide B (**6**), may be considered more promising than the other two phthalides because it is not toxic for the cells.

## 5. Concluding remarks

The results of this investigation provided evidence that semi-synthetic phthalides diketodiacid of diligustilide (**9**), intramolecular condensation product (**10**), and cyclotokinolide B (**6**) had anti-

inflammatory activities in the model of edema induced with TPA. We found that the semi-synthetic phthalides had higher activities than the natural phthalides, and that they modulated recruitment of polymorphonuclear leukocytes. In the carrageenan model, the intramolecular condensation product (**10**) showed an anti-inflammatory effect, but the mechanism was not clear. We also found that semi-synthetic phthalides showed poor activity against COX enzymes. The diketodiacyd of diligustilide (**9**), and intramolecular condensation product (**10**), showed inhibition on the production of oxide nitric in RAW cells, the cyclotokinolide B (**6**) displayed poor activity but this phthalide did not affect the cell viability.

## Acknowledgments

The authors would like to express thanks for financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project 102158) and from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA, PAPIIT IG200514). This article was part of the PhD thesis of M. Del Ángel for Doctorado en Ciencias Biomédicas at UNAM, and M. Del Ángel would like to acknowledge the scholarship provided by CONACYT (203829) and by UNAM (DGAPA, PAPIIT IG200514). The authors acknowledge Dr. Juan Rodríguez Silverio, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, for the donation of celecoxib, and Dr. Alejandra León and Dr. María Isabel Chávez (Instituto de Química, UNAM), and Sandra Daniela Rodríguez Montaña (Instituto de Fisiología, UNAM) for technical assistance.

## References

- Beck, J., Stermitz, F., 1995. Addition of methyl thioglycolate and benzylamine to (Z)-ligustilide, a bioactive unsaturated lactone constituent of several herbal medicines. An improved synthesis of (Z)-ligustilide. *J. Nat. Prod.* 58, 1047–1055.
- Beck, J., Chou, S., 2007. The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *J. Nat. Prod.* 70, 891–900.
- Bradley, P.P., Priebe, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Butler, M.S., 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22, 162–195.
- Chandna, N., Kumar, S., Kaushik, P., Kaushik, D., Roy, S.K., Gupta, G.K., Jachak, S.M., Kapoor, J.K., Sharma, P.K., 2013. Synthesis of novel celecoxib analogues by bioisosteric replacement of sulfonamide as potent anti-inflammatory agents and cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 4581–4590.
- Chung, J.W., Choi, R.J., Seo, E.-K., Nam, J.-W., Dong, M.-S., Shin, E.M., Guo, L.Y., Kin, Y.S., 2012. Anti-inflammatory effects of (Z)-Ligustilide through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B activation pathways. *Arch. Pharm. Res.* 35, 723–732.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 334–341.
- Dirsch, V.M., Kiemer, A.K., Wagner, H., Vollmar, A.M., 1997. The triterpenoid quinomethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 336, 211–217.
- Gábor, M., 2002. The mouse ear as a model for cutaneous irritation. *J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol.* 21, 191–202.
- Gautam, R., Srivastava, A., Jachak, S.M., Saklani, A., 2010. Anti-inflammatory, cyclooxygenase COX-2, COX-1 inhibitory and antioxidant effects of *Dysophylla stellata* Benth. *Fitoterapia* 81, 45–49.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- Gorzalczyk, S., López, P., Acevedo, C., Ferraro, G., 2011. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. *J. Ethnopharmacol.* 133, 994–998.
- Hawiger, J., 2001. Innate immunity and inflammation. *Immunol. Res.* 3, 99–109.
- Hernández-Valle, E., Herrera-Ruiz, M., Rosas Salgado, G., Zamilpa, A., Arenas Ocampo, M.L., Jiménez Aparicio, A., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E., 2014. Anti-inflammatory effect of 3-O-[(6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl sitosterol] from *Agave angustifolia* on ear edema in mice. *Phytochemistry* 19, 15624–15637.
- Huang, J., Lu, X.-Q., Zhang, C., Lu, J., Li, G.-Y., Lin, R.-C., Wang, J.-H., 2013. Antiinflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Fitoterapia* 91, 21–27.
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leucoc. Biol.* 77, 598–625.
- Laight, W.D., Lad, N., Woodward, B., Waterfall, J.F., 1994. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* 292, 81–88.
- Lee, J.L., Mukhtar, H., Bickers, D.B., Kopelovich, L., Athar, M., 2003. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharm.* 192, 294–306.
- León, A., Toscano, R.A., Tortoriello, J., Delgado, G., 2011. Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri*: sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives. *Nat. Prod. Res.* 25, 1234–1242.
- Linares, E., Bye, R.A., 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J. Ethnopharmacol.* 19, 153–183.
- Liu, L., Ning, Z.-Q., Shan, S., Zhang, K., Deng, T., Lu, X.-P., Cheng, Y.-Y., 2005. Phthalide lactones from *Ligusticum chuanxiong* inhibit lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  production and TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Planta Med.* 71, 808–813.
- Lo, T.N., Almeida, A.P., Beaven, M.A., 1982. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of Indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 261–267.
- Lo Faro, M.L., Fox, B., Whatmore, J.L., Winyard, P.G., Whiteman, M., 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric oxide* 41, 38–47.
- Moorcroft, M.J., Davis, J., Compton, R.G., 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* 54, 785–803.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K.M., Chan, C.C., 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128, 853–859.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.
- Niazi, J., Gupta, V., Chakarboroty, P., Kumar, P., 2010. Anti-inflammatory and antipyretic activity of *Aleuritis moluccana* leaves. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 3, 35–37.
- Payá, M., Ferrándiz, M.L., Erradi, F., Terencio, M.C., Kijjoa, A., Pinto, M., Alcaraz, M.J., 1996. Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *Eur. J. Pharmacol.* 312, 97–105.
- Prokopowicz, Z., Marcinkiewicz, J., Katz, D.R., Chain, B.M., 2012. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 60, 43–54.
- Quiroz, B.G., Hernández, L., Toscano, R.A., Sterner, O., Delgado, G., 2003. Base-catalyzed intramolecular condensation of tokinolide B. *Tetrahedron Lett.* 44, 2509–2512.
- Quiroz, B.G., Hernández, S.O., Sterner, O., Delgado, G., 2004. Transformations of the natural dimeric phthalide diligustilide. *Tetrahedron* 60, 3681–3688.
- Radcliff, F.J., Frases, J.D., Wilson, Z.E., Heapy, A.M., Robinson, J.E., Bryant, C.J., Flowers, C.L., Brimble, M.A., 2008. Anti-*Helicobacter pylori* activity of derivatives of the phthalide-containing antibacterial agents spirrolaxine methyl ether, CJ-12,954, CJ-13,013, CJ-13,102, CJ-13,104, CJ-13,108 and CJ-13,015. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6179–6185.
- Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F., Isakson, P., 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) induced dermal inflammation. *Inflammation* 10, 723–741.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Uriburu, L., Mániz, S., Cerdá, M., De la Fuente, J.R., Ríos, J.L., 2000. *In vivo* activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.* 66, 2509–2518.
- Ríos, M.Y., Delgado, G., Espinoza-Pérez, G., 1998a. Base-catalyzed intramolecular condensations of diligustilide. *Tetrahedron* 39, 6605–6608.
- Ríos, M.Y., Delgado, G., Toscano, R., 1998b. Chemical reactivity of phthalides. Relay synthesis of diligustilide, Rel-(3'R)-3',8'-dihydrodilugustilide and wallichilide. *Tetrahedron* 54, 3355–3366.
- Sacca, R., Cuff, C.A., Ruddle, N.H., 1997. Mediators of inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 851–857.
- Saeed, N.M., El-Demersdash, E., Abdel-Rahman, H.M., Algandaby, M.M., Al-Abbasi, F.A., Abdel-Naim, A.B., 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicol. Appl. Pharm.* 264, 84–93.
- Souren, P., Heung, S.S., Sun, C.K., 2012. Inhibition of inflammations and macrophage activation by ginsenoside-Re isolated from Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Food Chem. Toxicol.* 50, 1354–1361.
- Sulaiman, M.R., Perimal, E.K., Akhtar, M.N., Mohamad, A.S., Khalid, M.H., Tasrip, N.A., Mokhart, F., Zakaria, Z.A., Lajis, N.H., Israf, D.A., 2010. Anti-inflammatory effect of zerumbone on acute and chronic inflammation models in mice. *Fitoterapia* 81, 855–858.
- Susuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345–352.
- Vane, J.R., Botting, R.M., 1998. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.* 47, S78–S87.
- Wang, J., Du, J.-R., Wang, Y., Kuang, X., Wang, C.-Y., 2010. Z-ligustilide attenuates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response via inhibiting NF- $\kappa$ B pathway in primary rat microglia. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 791–797.
- White, M., 1999. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, S378–S381.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.
- Zhaoji, M., Lunhao, B., 2012. The anti-inflammatory effect of Z-ligustilide in experimental ovariectomized osteopenic rats. *Inflammation* 35, 1793–1797.