



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE UNA MEZCLA DE COMPUESTOS  
ACTIVOS PRESENTES EN MALVA PARVIFLORA EN UN MODELO MURINO DE  
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Cristina Elizabeth Ramírez Serrano

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leonor Pérez Martínez.  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Jesús Enrique Jiménez Ferrer  
Centro de investigación Biomédica del Sur – IMSS

Maribel Lucila Herrera Ruiz  
Centro de investigación Biomédica del Sur – IMSS

Ciudad de México. Febrero, 2024



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.

**TUTOR:**

Dra. Leonor Pérez Martínez

**ASESORES:**

Dr. Enrique Jiménez Ferrer. CIBIS-IMSS

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz. CIBIS-IMSS

**JURADO REVISOR DE TESIS**

Dra. Arias Alvarez Ana Brigida Clorinda

Dra. Olvera Carranza Clarita

Dr. Becerril Lijan Baltazar

Dra. Guerra Crespo Magdalena

Dr. Morán Andrade Julio

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento de DGAPA-UNAM (IN217822 y IN213119), CONACYT (IFC 2016-2282) y beca CONAHCYT de doctorado (464723).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Leonor Pérez Martínez por aceptar ser mi tutora, permitirme formar parte del grupo de investigación y dar seguimiento durante todo el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Maribel L. Herrera Ruiz y al Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer por su asesoría, seguimiento y evaluaciones durante el proyecto.

Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez por el apoyo y asesoría brindados durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Gustavo Pedraza por sus ideas, aportaciones y entusiasmo por el proyecto.

A la Dra. Nohemí Camacho por el apoyo experimental brindado.

A la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, la Dra. Clarita Olvera Carranza, el Dr. Baltazar Becerril Luján, la Dra. Magdalena Guerra Crespo y el Dr. Julio Morán Andrade por sus valiosas correcciones al escrito de tesis y formar parte de mi jurado de examen.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos recibidos.

Al Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) por permitirme desarrollar parte del proyecto dentro de sus instalaciones.

Al personal técnico del laboratorio de Neuroinmunobiología, IBt, UNAM, por el apoyo brindado.

Al personal técnico del área de Farmacología en el CIBIS, IMSS por el apoyo brindado.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) por el apoyo técnico, en especial a la Dra. Verónica Rojo León.

Al Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez por las asesorías y seguimiento para los experimentos de acoplamiento molecular.

A la unidad de bioterio IBt por permitirme el uso de sus instalaciones. A la M.V.Z. Elizabeth Mata y a la M.V.Z. Graciela Cabeza por el apoyo técnico brindado.

A todos mis compañeros de laboratorio, tanto del consorcio de Neuroinmunobiología en el IBt, como del área de Farmacología en el CIBIS, quienes me apoyaron en diferentes etapas durante el proyecto.

A los animales experimentales, que involuntariamente dan su vida por la ciencia.

A mis amigos por estar conmigo y apoyarme. Por ayudarme a olvidar lo complicado y ayudarme a relajar y ver la vida más ligera.

A mi familia por siempre estar presentes en mi vida, enseñándome, queriéndome y apoyándome cada uno a su manera.

## **DEDICATORIA**

Dedico con todo mi corazón esta tesis a:

Mi esposo, Leonel Vargas, que ha estado a mi lado apoyándome en cada paso y es ese pilar en quien puedo sostenerme cuando las cosas pesan mucho y cuesta trabajo llevarlas. Que me ha motivado a ser mejor y quererme más y me ha dado todo su amor a diario.

Mi hija, Xa, que es mi más grande motivación y felicidad, y me enseña que la vida tiene muchos aristas y formas de vivirla.

Mi madre, Esperanza Ramírez, que me formó en la mujer que soy hoy, me dio todo su amor, y muchas oportunidades y enseñanzas. Ella sembró esa voz en mi cabeza que me anima a seguir mis sueños y convicciones y sigue caminando a mi lado y cuidándome desde donde esta.

## INDICE

Lista de abreviaturas.....	10
Resumen.....	12
Abstract.....	13
1.- Introducción.....	14
1.1.- Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer.....	14
1.2.- Características clínicas de la EA.....	14
1.3.- Hipótesis amiloidea de la EA .....	14
1.4.- Hipótesis colinérgica de la EA .....	15
1.5.- Factores asociados al desarrollo de la EA.....	16
1.6.- Inmunidad innata y riesgo de padecer EA.....	16
1.7.- Anti-inflamatorios no esteroideos y la EA.....	18
1.8.- Modelos murinos utilizados para el estudio de la EA.....	18
1.9.- Tratamientos disponibles para tratar los síntomas de la EA.....	18
1.10.- Derivados de plantas con actividad farmacológica.....	19
2.- Antecedentes.....	20
2.1.- Generalidades de <i>Malva parviflora</i> .....	20
2.2.- Composición química de <i>Malva parviflora</i> .....	21
2.3.- Efecto farmacológico de <i>Malva parviflora</i> .....	21
3.- Hipótesis.....	24



4.- Objetivos.....	24
4.1.- Objetivo general.....	24
4.2.- Objetivos particulares.....	24
5.- Estrategia experimental.....	25
5.1.- Animales.....	26
5.2.- Laberinto acuático de Morris.....	27
5.3.- Suspensión por la cola.....	27
5.4.- Campo abierto.....	27
5.5.- Perfusión y corte de cerebros.....	28
5.6.- Tinción de Tioflavina-S.....	28
5.7.- Tinción de Tioflavina-S en conjunto con inmunofluorescencia.....	28
5.8.- ELISA.....	29
5.9.- qPCR.....	29
5.10.- Ensayo en macrófagos RAW-Blue.....	30
5.11.- Determinación de CE <sub>50</sub> .....	30
5.12.- Análisis por desplazamiento de la curva.....	31
5.13.- Análisis isobolográfico.....	31
5.14.- Acoplamiento molecular.....	31
6.- Resultados.....	32
6.1.- Evaluación de la fracción MpF10 en un modelo murino de la EA.....	32

6.1.1.- Efecto de la MpF10 sobre el aprendizaje y la memoria en un. Modelo murino de la EA.....	32
6.1.2.- Efecto de la MpF10 sobre el comportamiento tipo depresión, y la actividad motora y exploratoria en un modelo murino de la EA.....	35
6.1.3.- Efecto de la MpF10 sobre los niveles de TNF e IL-1 $\beta$ en Cerebro en un modelo murino de la EA.....	37
6.1.4.- Efecto de la MpF10 sobre la deposición del péptido $\beta$ - amiloide en un modelo murino de la EA.....	38
6.2.- Efecto anti-inflamatorio e interacciones farmacológicas de 5 compuestos de <i>M. parviflora</i> sobre la línea celular RAW-Blue.....	40
6.3.- Evaluación de dos combinaciones de compuestos presentes en <i>M. parviflora</i> en ratones 5XFAD.....	43
6.3.1.- Efecto de dos combinaciones de compuestos presentes en <i>M. parviflora</i> sobre el aprendizaje y la memoria en un modelo murino de la EA.....	44
6.3.2.- Efecto de dos combinaciones de compuestos presentes en <i>M. parviflora</i> sobre los niveles de IL-1 $\beta$ y TNF en cerebro en un modelo murino de la EA.....	45
6.3.3.- Efecto de dos combinaciones de compuestos presentes en <i>M. parviflora</i> sobre el estado de activación de la microglía en un modelo murino de la EA.....	45
6.3.4- Efecto de la combinación 1 de compuestos presentes en <i>M. parviflora</i> sobre la formación de placas de $\beta$ amiloide en un modelo murino de la EA.....	50

6.4.- Búsqueda de posibles blancos moleculares para escopoletina y daucosterol mediante acoplamiento molecular.....	52
7.- Discusión.....	54
8.- Conclusiones.....	63
9.- Perspectivas.....	64
10.- Bibliografía.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – Anti-inflamatorios no esteroideos

AO – Ácido oleanólico

AP1 – Proteína activadora 1

APP – Proteína precursora amiloide

AU – Ácido ursólico

$\beta$ A – Beta amiloide

CA – Campo abierto

CE<sub>50</sub> – Concentración efectiva 50

ChAT – Colina acetil transferasa

DEPC - Dietilpirocarbonato

EMax – Efecto máximo

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

E – Este

EA - Enfermedad de Alzheimer

ELISA - Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Esc – Escopoletina

FAD - Enfermedad de Alzheimer

INT $\gamma$  – Interferón gamma

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

LAM – Laberinto acuático de Morris

LPS – Lipopolisacáridos

MpDau – Daucosterol aislado de *Malva parviflora*

MpF10 – Fracción 10 del extracto de diclorometano de *Malva parviflora*

MpHA – Extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora*

N – Norte

NFkB - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NMDA – N- metil- D Aspartato

NO -Noroeste

O – Oeste

ONFs – Ovillos neurofibrilares

O<sub>2</sub> – Oxígeno

PPARγ - Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma

PS – Placas seniles

qPCR - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa

S – Sur

SC – Suspensión por la cola

SN – Sistema nervioso

SNC – Sistema nervioso central

Tili – Tilirósido

TNF – Factor de necrosis tumoral

WT – Silvestre

ZP – Zona de la plataforma

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer, una afección neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de capacidades mentales, afecta significativamente la calidad de vida tanto de los pacientes como de los cuidadores. A pesar de su alta incidencia, no existe actualmente un medicamento que no solo mejore los síntomas, sino que también retrase su progresión. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan el pronóstico de los pacientes es de vital importancia. Por ello, el presente trabajo propone una alternativa terapéutica derivada de *Malva parviflora*, que exhibe propiedades anti-inflamatorias y un efecto neuroprotector en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

En este estudio se evaluó el efecto neuroprotector de una fracción de *Malva parviflora* en un modelo murino de EA. Posteriormente, se seleccionaron cinco compuestos, incluido uno de la fracción 10 y cuatro de un extracto hidroalcohólico, para evaluar sus interacciones farmacológicas en un modelo de inflamación con macrófagos en cultivo. Se observó que la Combinación 1, compuesta por escopoletina y daucosterol, presenta una interacción sinérgica. Además, se determinó que la C1 ejerce un efecto inmunomodulador y neuroprotector en un modelo murino de EA. Esta combinación mejora el rendimiento cognitivo, regulando el estado inflamatorio cerebral y promoviendo el fenotipo de la microglía asociado a enfermedad tipo 2, aumentando su capacidad fagocítica y reduciendo la deposición del péptido beta amiloide en animales 5XFAD tratados.

Finalmente, en este proyecto se sugiere que los receptores  $\beta$  de la hormona tiroidea y los receptores nicotínicos de la acetilcolina podrían ser blancos moleculares de la C1, basándose en la literatura y experimentos de modelado por acoplamiento molecular. Aunque la C1 se presenta como una posible aproximación terapéutica para tratar la EA, es crucial continuar con su estudio para confirmar su eficacia y seguridad en humanos.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative condition characterized by the loss of mental abilities, significantly impacting the quality of life for both patients and caregivers. Despite its global prevalence and substantial impact, there is currently no effective treatment available to halt or delay its progression; existing interventions merely address certain symptoms. Consequently, there is a critical need for the exploration of novel therapeutic strategies aimed at enhancing patient prognosis.

In this context, recognizing the pivotal role of inflammation in the progression of AD, this study proposes a therapeutic alternative derived from *Malva parviflora*. This botanical derivative exhibits anti-inflammatory properties and a neuroprotective effect in a mouse model of AD. To investigate this therapeutic potential, the neuroprotective effect of a *Malva parviflora*-derived fraction was assessed within the context of AD. Subsequently, one compound from this fraction and four additional compounds from the hydroalcoholic extract of *Malva parviflora* were selected to evaluate their interactions in an inflammation model using a macrophage cell line. The results revealed that Combination 1, composed of scopoletin and daucosterol, exhibited a synergistic interaction. Moreover, it was determined that C1 exerts both immunomodulatory and neuroprotective effects in a mouse model of AD. This compound combination improved cognitive performance in 5XFAD animals, potentially through the regulation of the inflammatory state in the brain and by promoting the stage 2 Disease Associated Microglia phenotype. This led to an augmentation of their phagocytic capacity, subsequently reducing the deposition of amyloid beta peptide in treated animals.

Finally, hormone thyroid receptor  $\beta$  and acetylcholine nicotinic receptors are proposed as potential molecular targets of C1, based on a comprehensive review of the literature and molecular docking modeling experiments. In conclusion, C1 emerges as a promising therapeutic approach for the treatment of AD. However, further studies are needed to confirm its efficacy and safety in human subjects.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer**

La demencia es un trastorno neurodegenerativo con una muy alta prevalencia e incidencia; actualmente alrededor de 55 millones de personas en el mundo la padecen y cada año surgen cerca de 10 millones de casos nuevos, por lo que se cree que para 2050 existirán alrededor de 131.5 millones de personas con este padecimiento a nivel global<sup>1,2</sup>. Este aumento exponencial de casos se debe en gran parte a que varios tipos de demencia tienen como principal factor de riesgo el envejecimiento, y es bien conocido que actualmente se está llevando a cabo una inversión en la pirámide poblacional, que conlleva un aumento en la población de mayor edad, debido a los avances tecnológicos en el campo de la medicina, lo cual permite una mayor esperanza de vida. La alta prevalencia de la demencia resulta de especial importancia, ya que es una de las principales causas de incapacidad y dependencia<sup>2</sup>, afectando la calidad de vida tanto de los pacientes como de sus cuidadores. Sumado a lo anterior, la demencia genera altos costos, estimándose que a nivel global en 2015, fue de \$818 billones de dólares<sup>1</sup>. Existen diferentes tipos de demencia, siendo la enfermedad de Alzheimer (EA) el más común, con una proporción mundial de alrededor del 60% al 70%<sup>2</sup>.

La EA fue identificada por primera vez hace más de 100 años<sup>3</sup>; sin embargo, ha sido hasta los últimos 30 años que ha ganado ímpetu el estudio de sus síntomas, causas, factores de riesgo y tratamientos.

### **1.2.- Características clínicas de la EA**

Además del declive cognitivo característico del padecimiento que incluye pérdida en la capacidad de aprendizaje y memoria, en la EA se observa un cuadro clínico que varía entre pacientes, pero puede incluir afasia, problemas visuales, simultanagnosia, ataxia ocular, alteraciones en el comportamiento y algunos síntomas neuropsiquiátricos, como ansiedad y depresión<sup>4</sup>.

### **1.3.- Hipótesis amiloidea de la EA**

Si bien es cierto que no hay una clara línea sobre la etiología de esta enfermedad, sí se han identificado elementos determinantes para el desarrollo de ésta, como la muerte



neuronal. Además, ocurren dos alteraciones histopatológicas que sobresalen: los ovillos neurofibrilares (ONFs) y las placas seniles (PS).

Los ONFs, son lesiones intracelulares que se desarrollan en las neuronas piramidales de la corteza entorrinal y progresan al subículo, al hipocampo y al resto de las neuronas hipocámpales de la corteza cerebral (estadios de Braak); así como en neuronas con axones muy largos de los núcleos sub-corticales. Éstas consisten principalmente de filamentos aberrantes de la proteína *tau* hiperfosforilada<sup>5</sup>, la cual en condiciones fisiológicas normales tiene un papel como estabilizador de los microtúbulos en las neuronas.

Por otro lado, las PS son agregados extracelulares compuestos principalmente del péptido  $\beta$  amiloide ( $\beta$ A), el cual se produce a partir del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP por sus siglas en inglés) por la  $\beta$ - y la  $\gamma$ - secretasa. Bajo condiciones fisiológicas, la APP es cortada principalmente por la  $\alpha$  secretasa, dando lugar al fragmento C83 y al sAPP $\alpha$ , involucrados en funciones de regulación neuronal, excitabilidad, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. Sin embargo, en condiciones patológicas, se favorece su procesamiento por la  $\beta$ -secretasa; dando lugar a los fragmentos sAPP $\beta$  y C99<sup>6</sup>. Posteriormente el fragmento C99 es cortado por la  $\gamma$ -secretasa, resultando en la liberación de péptido  $\beta$ A, lo cual promueve la pérdida sináptica, disminución en la plasticidad sináptica, disfunción mitocondrial y muerte neuronal<sup>6,7</sup>. En este contexto, la “hipótesis amiloidea” de la EA, propone que gran parte de la fisiopatología de esta enfermedad se deriva de la disrupción en la homeostasis que regula la escisión de la APP, favoreciendo el procesamiento amiloidogénico<sup>8</sup>, lo cual podría resultar de factores genéticos, ambientales o relacionados al envejecimiento.

#### **1.4.- Hipótesis colinérgica de la EA**

Aunque controversial en los últimos años, otra hipótesis propuesta para explicar la etiología de los síntomas presentes en la EA es la “hipótesis colinérgica”, la cual sugiere que una disfunción en la vía colinérgica dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) contribuye substancialmente al declive observado en los pacientes que la padecen<sup>8,9</sup>. Esto es la base de la mayoría de los tratamientos prescritos al momento, de los que se hablará más adelante. Por otro lado, existen algunas evidencias que desafían esta hipótesis, por ejemplo, DeKosky y colaboradores encontraron una reducción en los niveles de la colina

acetiltransferasa (ChAT), la enzima encargada de la formación de acetilcolina, únicamente en la corteza de pacientes con EA en etapas terminales. Sin embargo, al inicio de la enfermedad no se observó dicha disminución, indicando que esta disfunción no es una de las causas principales para el desarrollo temprano de la enfermedad<sup>10</sup>.

### **1.5.- Factores asociados al desarrollo de la EA**

Como ya se mencionó de manera muy breve, existen diferentes factores que pueden favorecer el procesamiento amiloidogénico de la PPA, éstos pueden ser genéticos, ambientales o relacionados al envejecimiento.

Dentro de los factores genéticos se encuentran principalmente las mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* (codificantes para APP, presenilina 1 y presenilina 2 respectivamente), las cuales conducen de manera inevitable al desarrollo de la EA “familiar” (FAD, *familiar Alzheimer disease*, por sus siglas en inglés). Para el caso del gen *APP* se han reportado alrededor de 30 mutaciones, varias de ellas, cerca del sitio de corte de  $\gamma$ -secretasa, y dos que promueven un incremento en los niveles de la proteína silvestre (wild-type), por otro lado, para *PSEN1* se han descrito alrededor de 180 mutaciones y para *PSEN2* cerca de 14<sup>11,12</sup>. La FAD es poco común, constituyendo solo un 5% o menos de los casos totales, implicando que el otro 95% de los casos tienen una etiología desconocida y multifactorial. En este sentido, se han identificado ya ciertos factores de riesgo que promueven el desarrollo de esta enfermedad. Algunos de estos factores son la edad avanzada, traumatismos cerebrales, algunos factores sociales, infecciones sistémicas, obesidad, actividad física reducida, y enfermedades crónicas como la diabetes y la hipertensión, donde la mayoría, o todos, involucran la activación del sistema inmune innato, propiciando un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante, que se ha sugerido, ejercen efectos dañinos en el SNC que perduran mucho más tiempo que el estímulo original<sup>13-16</sup>.

### **1.6.- Inmunidad innata y riesgo de padecer EA.**

Históricamente, la neuroinflamación se había visto ligada a la EA como una respuesta a las PS, sin embargo, recientemente se ha asociado desde una perspectiva diferente, asignándole un papel muy importante en el proceso de iniciación de la cascada neurodegenerativa presente en dicha enfermedad. Al considerar entonces los factores de

riesgo ya mencionados, se ha propuesto que el proceso inflamatorio podría originarse inicialmente a nivel periférico y llegar posteriormente a SNC a través de un daño en la función de la barrera hematoencefálica<sup>17</sup>.

Existen evidencias experimentales en las que la inflamación sistémica derivada de diferentes estímulos como son infecciones de diversos tipos, administración de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas, una dieta alta en grasas o padecimientos como diabetes e hipertensión, inducen o exacerbaban el desarrollo de ciertas características de la enfermedad, como pérdida de proteínas sinápticas, deposición de agregados amiloides, mayor actividad de la  $\beta$ -secretasa y problemas cognitivos<sup>16,18-20</sup>.

En este contexto, moléculas pro-inflamatorias y/o pro-oxidantes como interferón gamma (INF- $\gamma$ ), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), óxido nítrico (ON) y oxígeno O<sub>2</sub>, se encontrarían circulando en la periferia de forma crónica; alcanzando al SNC después de atravesar la BHE, la cual en condiciones íntegras regula el transporte de células y moléculas entre la sangre y el cerebro, pero cuya función puede verse comprometida ante ciertas condiciones como son hipertensión, tumores, radiación, infecciones, enfermedades metabólicas y envejecimiento<sup>16,21-23</sup>.

Una vez dentro del sistema nervioso (SN), el proceso inflamatorio continúa, orquestado por los dos principales componentes del sistema inmune innato dentro del SNC, la microglía<sup>22</sup> y los astrocitos. La microglía son los macrófagos residentes del cerebro, tienen un origen mielóide y en condiciones de salud tiene un rol principalmente fagocítico, removiendo neuronas dañadas y patógenos; y al mismo tiempo promueven la reparación del tejido dañado. Por otro lado, los astrocitos también constituyen células gliales especializadas que remueven restos celulares y toxinas, a la vez que liberan factores neuroprotectores. Durante la neuroinflamación incluida la que ocurre en la EA, la proliferación de ambos tipos celulares aumenta y su morfología se modifica en un proceso denominado gliosis, en el cual son liberadas moléculas pro-inflamatorias, amplificando el proceso inflamatorio y dañando el tejido, si este estado se mantiene de forma crónica<sup>24,25</sup>.

### **1.7.- Anti-inflamatorios no esteroideos y la EA.**

La relación entre la EA y los procesos inflamatorios es tan clara que incluso se ha propuesto que la administración de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) durante periodos prolongados (2-3 años) en personas asintomáticas, reduce la incidencia de ésta en pacientes asintomáticos<sup>26,27</sup>. Sin embargo este tipo de medicamentos están lejos de representar al tratamiento óptimo, ya que no todos los reportes respaldan este efecto protector, el cual parece depender de la duración y momento de administración, así como del tipo de AINE evaluado<sup>27,28</sup>. Sumado a esto, se sabe que su consumo crónico lleva a efectos no deseados de importancia medica como son gastropatías<sup>29</sup> y eventos vasculares<sup>30</sup>.

### **1.8.- Modelos murinos utilizados para el estudio de la EA**

Gracias al conocimiento que ya existe acerca de esta enfermedad y con el fin de generar mayor comprensión de la misma, existen diferentes modelos murinos de la EA, entre los más comunes se encuentran los que utilizan animales transgénicos, como los Tg2576 (mutación sueca en APP), 3xTg (mutación sueca en APP, P301L en tau y PS1M146V knock-in) y PSAPP (PS1M146V + APP-Swedish), los cuales reproducen algunas de las marcas características de la enfermedad, que aparecen entre los 6 y 13 meses de edad del ratón.

Otro modelo transgénico cada vez más usado, son los ratones 5XFAD, los cuales tienen 5 mutaciones, 3 que sobre expresan la APP y 2 en PSN1 (APP K670N/M671L (Swedish), I716V (Florida), V717I (London) y PS1 M146L L286V), por lo que presentan muchas de las características de la EA. Algunas de éstas son: placas amiloides, gliosis, marcadores sinápticos reducidos, pérdida neuronal y deterioro cognitivo, a edades tempranas<sup>31</sup>. Además de los modelos transgénicos, también existen algunos otros, como es la inyección intracerebroventricular del péptido  $\beta$ A en ratones; lo cual genera neurotoxicidad y el desarrollo de un fenotipo similar al de la EA, entre lo que se encuentra el declive cognitivo de los animales<sup>32</sup>.

### **1.9.- Tratamientos disponibles para tratar la EA**

Los medicamentos comúnmente usados para el tratamiento de la EA se basan en la hipótesis que sugiere que una disfunción en la vía colinérgica dentro de SNC posee un

papel esencial en el declive observado en los pacientes que la padecen. Así, la mayoría de los fármacos usados para el tratamiento de esta enfermedad se enfocan en compensar esta disfunción colinérgica que se presenta en el padecimiento particularmente en el hipocampo, utilizando inhibidores de la acetilcolinesterasa. Ejemplos de algunos son el Donezepil, la rivastigmina y la Galantamina. De igual forma, otros medicamentos comúnmente administrados a los pacientes con EA incluyen los antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA; receptor ionotrópico de glutamato) y algunos anti-psicóticos<sup>33,34</sup>.

Es importante señalar que durante este padecimiento es común encontrar la prescripción de múltiples fármacos para contrarrestar los diferentes síntomas presentes, todos los cuales ayudan a mejorar la calidad de vida durante un tiempo limitado, pero no logran evitar la progresión de la enfermedad.

#### **1.10.- Derivados de plantas con actividad farmacológica**

Debido a la escasez de fármacos para tratar la EA, y siendo esta comúnmente una enfermedad multifactorial sin una etiología bien definida; resulta necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que aborden esta enfermedad desde su complejidad e involucren diferentes mecanismos de acción en vías que intervienen en su desarrollo. Tal es el caso de la modificación molecular para la obtención de fármacos híbridos, y los tratamientos combinados que involucran la administración conjunta de diferentes moléculas activas. En este sentido, una de las fuentes más utilizadas para la obtención de este tipo de medicamentos, son los organismos vegetales, gracias a su riqueza y diversidad en compuestos farmacológicamente activos. Ejemplo de esto es la planta china *Tripterygium wilfordii*, la cual contiene Tripchlorolide (T4), la cual muestra un efecto neuroprotector en ratones transgénicos 5XFAD, ya que mejora su aprendizaje espacial y memoria, disminuye la pérdida sináptica y promueve la activación de la vía fosfoinositol-3-cinasa-Akt, además de reducir los niveles de  $\beta$ A y la expresión de  $\beta$ -secretasa<sup>35</sup>. Otro ejemplo es *Arctium lappa*, de la cual se deriva la Arctigenina, capaz de disminuir la traducción de  $\beta$ -secretasa vía desfosforilación de eIF2 $\alpha$ , inhibiendo así la producción de  $\beta$ A, además de promover su eliminación, al favorecer la autofagia a través de AMPK y mTOR, con lo que logra disminuir el daño en la memoria en un modelo murino transgénico<sup>36</sup>.

## 2.- ANTECEDENTES

México es un país sumamente diverso y cuenta con una gran variedad florística que forma parte del acervo etnomédico-cultural, a partir del cual pueden explorarse nuevas opciones con potencial en el tratamiento de la EA. Ejemplo de esto es *Malva parviflora*.

### 2.1.- Generalidades de *Malva parviflora*.

*Malva parviflora* es una planta herbácea con sinonimia popular que varía dependiendo de la región, nombrándose por ejemplo como hala, malva, malva de campo, malva de castilla y malva de quesitos, entre otros<sup>37</sup>.

Su clasificación taxonómica es<sup>38</sup>:

Reino: *Plantae*  
 Subreino: *Viridiplantae*  
 Filum: *Tracheophyta*  
 Subphylum: *Euphyllophytina*  
 Clase: *Spermatopsida*  
 Subclase: *Magnoliidae*  
 Superorden: *Rosanae*  
 Orden: *Malvales*  
 Familia: *Malvaceae*  
 Subfamilia: *Malvoideae*  
 Tribu: *Malvae*  
 Género: *Malva*  
 Especie: *Malva parviflora* L.

*Malva parviflora* es originaria de Europa e introducida en América, actualmente con una amplia distribución en este territorio. Tiene una altura aproximada de 60 cm; con hojas simples, reniformes, crenadas, onduladas, con peciolo largo y de hasta 4.5 cm de longitud y 7 cm de ancho; con flores pequeñas, de color lila o blanco, en inflorescencias de 1 a 4 flores; semillas reniformes; y fruto circular u ovado de 2 mm aproximadamente<sup>39</sup>. Esta especie crece principalmente en bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y bosque espinoso, también se asocia a vegetación perturbada, creciendo a orilla de caminos y en terrenos de cultivo abandonados<sup>37</sup>. *Malva parviflora* es una planta de uso frecuente y extendido en nuestro país hoy en día; sus usos médicos tradicionales incluyen su consumo como tratamiento anti-inflamatorio en caso de golpes, heridas o abscesos; así como durante la inflamación de garganta, estómago, intestino, mucosas, riñones y pulmones,

entre muchos otros. Además de su uso como anti-inflamatorio, también se emplea para disminuir la fiebre, como analgésico en ciertos casos, como anti-helmíntico y para tratar lesiones leves en la piel. Comúnmente se recomienda beber el cocimiento o en forma de fomentos o emplastos<sup>37</sup>.

## **2.2.- Composición química de *Malva parviflora***

*Malva parviflora* es una planta que ha sido poco caracterizada químicamente; sin embargo, se sabe de su contenido rico en flavonoides y compuestos fenólicos<sup>40,41</sup>. Igualmente, se ha reportado que contiene algunos alcaloides, esteroides, terpenos, saponinas, resinas, taninos, flavonoles, fenilpropanoides, aminoácidos aromáticos, terpenos y monosacáridos neutros y ácidos<sup>40-44</sup>. Sumado a esto, recientemente dentro de nuestro grupo de investigación se ha determinado que su extracto hidroalcohólico contiene escopoletina (Esc), una cumarina, y ácido oleanólico (AO) un triterpeno<sup>20</sup>.

## **2.3.- Efecto farmacológico de *Malva parviflora***

Existen varios reportes de la actividad farmacológica de *Malva parviflora* que demuestran algunos de sus efectos, como por ejemplo la actividad quelante de metales del extracto metanólico de sus hojas<sup>45</sup>; el efecto antibacteriano de los extractos hexánico, metanólico y acuoso de sus hojas y raíces<sup>46</sup>; el anti-fúngico de un extracto de semillas<sup>47</sup>; el hipoglucemiante de los extractos hexánico, clorofórmico, y metanólico de hojas<sup>48</sup>; el anti-hipertensivo de un extracto hidroalcohólico y sus fracciones acuosa y orgánica de hojas<sup>40</sup>; el gastro-protector de un mucilago obtenido de hojas y frutos<sup>44</sup>, el anti-oxidante de un extracto metanólico<sup>45</sup>, uno hidroalcohólico y sus fracciones acuosa y orgánica de hojas<sup>40</sup>; el anti-inflamatorio de los extractos metanólico, hexánico y acuoso de hojas y raíces<sup>45,46</sup>; así como de un mucilago obtenido de hojas y frutos<sup>44</sup>, y el neuroprotector del extracto etanólico de hojas y el hidroalcohólico de partes aéreas<sup>20,49</sup>.

Dentro de lo reportado para *M. parviflora*, resalta su efecto anti-inflamatorio y neuroprotector, que la sugiere como posible fuente de un tratamiento efectivo para aminorar el desarrollo y los síntomas presentes en la EA. En este contexto, dentro de nuestro grupo de investigación, se generó un extracto hidroalcohólico de sus partes aéreas (MPHA), el cual, se determinó que posee actividad anti-inflamatoria, ya que inhibe la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

activadas (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP1) en células RAW-Blue<sup>20</sup>, línea celular de macrófagos que presentan un gen reportero bajo elementos de respuesta a estos factores de transcripción importantes en procesos inflamatorios. Más aún, en el trabajo de Medrano-Jiménez y cols, se reportó que el MpHA, es capaz de revertir el efecto deletéreo en el aprendizaje y la memoria de ratones 5XFAD, un modelo de la EA. Ésto, a través de modular el proceso inflamatorio que se desarrolla en el SN de estos animales, ya que por un lado disminuye la astrogliosis reactiva observada mediante inmunofluorescencia en cortes de cerebro y por otro lado reduce los niveles de transcrito de CD86 y TNF en microglía aislada de estos ratones, los cuales son característicos de su fenotipo proinflamatorio M1; promoviendo así la acumulación de microglía alrededor de las placas  $\beta$ A y disminuyendo la deposición de éstas. Como parte del mecanismo de acción de dicho extracto, se ha determinado que aumenta la capacidad fagocítica de microglía en cultivo, a través de un mecanismo dependiente de CD36, un receptor “scavenger”, importante en la fagocitosis de la microglía, y el receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR $\gamma$ ), un receptor nuclear que aumenta los niveles de CD36. Lo anterior, ya que MpHA es capaz de aumentar los niveles de CD36 *in vivo*, en animales 5XFAD, sin embargo, al administrar GW9662, un antagonista de PPAR $\gamma$ , se suprime el efecto de MpHA. Sumado a ésto, se identificaron dos de sus compuestos farmacológicamente activos, la Esc y el AO<sup>20</sup>, ambos con actividad antiinflamatoria<sup>50-54</sup> y neuroprotectora reportada anteriormente<sup>55-58</sup>. Finalmente, se determinó que el AO es capaz de aumentar los niveles de PPAR $\gamma$  en cultivos primarios de microglía, respaldando su importante participación en el efecto global ejercido por el MpHA en el modelo *in vivo*.

Como puede observarse, el efecto benéfico del MpHA sobre la patología que desarrollan los animales 5XFAD es claro y pudiera ser resultado de su complejidad y riqueza en compuestos farmacológicamente activos que tienen como blanco diversas moléculas que participan dentro de la intrincada fisiopatología de la EA. Además, el efecto producido refuerza la idea de que, dentro de sus componentes, se encuentran algunos que pudieran resultar de interés por su posible capacidad de aminorar el desarrollo y los síntomas presentes en este padecimiento. Sin embargo, esta misma riqueza y complejidad de compuestos en el MpHA, resulta extremadamente complicada para caracterizar química y farmacológicamente. Por lo tanto, es necesario buscar dentro de estos mismos componentes, aquella combinación específica que reproduzca el efecto benéfico observado con este extracto. En este sentido y como primera aproximación para obtener



una mezcla menos compleja de estos compuestos, que recapitulara el efecto anti-inflamatorio y neuroprotector, se generó una fracción antiinflamatoria (MpF10) de *M. parviflora*, a través de un ensayo biodirigido. Se observó que MpF10, al igual que su compuesto mayoritario identificado como daucosterol (MpDau); son capaces de inhibir la activación de NFκB y AP1 en la línea celular RAW-Blue, así como disminuir la astrogliosis reactiva en un modelo murino de neuroinflamación inducido con inyecciones intraperitoneales de LPS, y mejorar la capacidad de aprendizaje y memoria en estos animales<sup>59</sup>.

Por lo tanto, dado que MpHA presenta efecto neuroprotector en un modelo murino de la EA y la MpF10 posee actividad neuroprotectora en un modelo de neuroinflamación; se sugiere que *M. parviflora* representa una fuente rica en compuestos farmacológicamente activos a partir de los cuales podría obtenerse un posible tratamiento para aminorar el desarrollo y los síntomas presentes en la EA. Sin embargo, resulta de gran importancia el diseño y propuesta de un posible fármaco que posea el efecto anti-inflamatorio y neuroprotector observado con el MpHA y la MpF10, pero de una composición conocida. Con lo cual se permitiría una caracterización química y farmacológica completa y por lo tanto, mayor control y seguridad del posible producto. En este contexto, nos planteamos la siguiente hipótesis.

### **3.- HIPÓTESIS**

Una mezcla específica de compuestos bioactivos aislados de malva parviflora disminuye algunas de las características patológicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer en el modelo murino.

### **4.- OBJETIVOS**

#### **4.1.- Objetivo general.**

Proponer y evaluar una mezcla específica de compuestos activos presentes en *M. parviflora* en un modelo de la enfermedad de Alzheimer.

#### **4.2.- Objetivos particulares**

- 1.- Caracterizar el efecto neuroprotector de la fracción MpF10 en un modelo murino de la EA.
- 2.- Diseñar un fármaco combinado con propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras a partir de los compuestos presentes en *M. parviflora*.
3. Caracterizar el efecto neuroprotector del fármaco obtenido, en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.
4. Modelar la interacción de los compuestos del fármaco con sus posibles blancos moleculares.

## 5.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

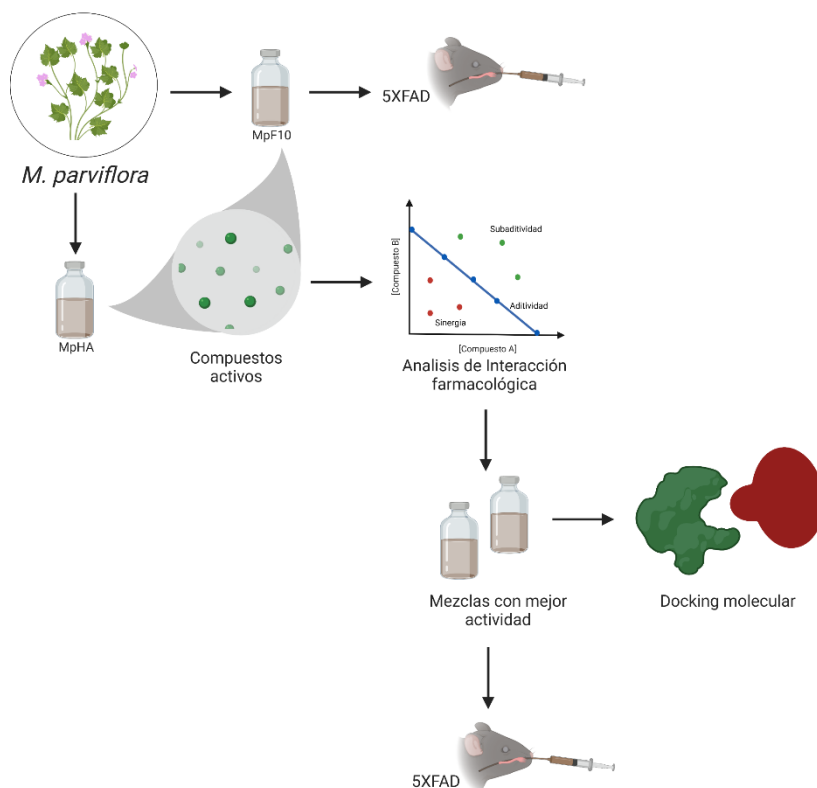
Para cumplir con los objetivos planteados anteriormente, la estrategia experimental utilizada se esquematiza en la figura 1.

Como primera parte del proyecto se planteó evaluar el efecto neuroprotector de la MpF10 en un modelo murino de la EA. Para esto, se utilizaron ratones 5XFAD. Se formaron 8 grupos de acuerdo con el genotipo y el tratamiento a administrar, quedando: 1) WT/Veh, 2) 5XFAD/Veh, 3) WT/MpF10, 4) 5XFAD/MpF10, 5) WT/MpDau, 6) 5XFAD/MpDau, 7) WT/MpHA, 8) 5XFAD/MpHA. Al término del tratamiento, los animales fueron sometidos a pruebas conductuales para evaluar: el aprendizaje, la memoria, el comportamiento tipo depresión y la actividad motora y de exploración. Además de esto, a partir de muestras biológicas se les determinó la presencia de placas del péptido  $\beta$ -amiloide y los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF en cerebro.

Por otro lado, se determinaron las interacciones farmacológicas de 5 compuestos presentes en *M. parviflora*. Lo anterior, mediante el análisis de “desplazamiento de la curva” e “isoblograma” efectuado en macrófagos de la línea celular RAW Blue. Los compuestos utilizados fueron: Esc, tilirósido (Tili), AO, ácido ursólico (AU) y MpDau.

Una vez determinadas las combinaciones con interacción sinérgica y el mejor efecto anti-inflamatorio, éstas se evaluaron en ratones 5XFAD. Se formaron 10 grupos de acuerdo con el genotipo y el tratamiento a administrar, quedando: 1) WT/Veh, 2) 5XFAD/Veh, 3) WT/C1, 4) 5XFAD/C1, 5) WT/C2, 6) 5XFAD/C2, 7) WT/Mel, 8) 5XFAD/Mel, 9) WT/MpHA, 10) 5XFAD/MpHA. Al término del tratamiento, se les realizaron diversas pruebas conductuales para evaluar el aprendizaje y la memoria, el comportamiento tipo depresión y la actividad motora y de exploración. A partir de muestras biológicas de cerebro, se midieron los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF, se cuantificaron las placas de péptido  $\beta$ -amiloide, se describió la morfología de la microglía adyacente a las placas y la determinación de su fenotipo.

Finalmente, se modeló mediante acoplamiento molecular, la interacción entre los compuestos que conforman la C1 y algunos posibles blancos.



**Figura 1. Esquema de la estrategia experimental.** Se evaluó el efecto de la fracción 10 de *M. parviflora* (MpF10) en ratones 5XFAD. Posteriormente, se seleccionaron diferentes compuestos identificados en la MpF10 o el extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* (MpHA), a partir de los cuales se evaluó su interacción farmacológica en un modelo de inflamación en la línea celular RAW-Blue. A partir de esto, se seleccionaron dos mezclas de compuestos con interacción sinérgica, las cuales fueron evaluadas en los animales 5XFAD. Adicionalmente, se propusieron posibles blancos moleculares para los compuestos que conformaban la mezcla con mejor actividad y se modeló su interacción mediante acoplamiento molecular.

### 5.1.- Animales:

Se utilizaron animales 5XFAD, los cuales expresan 5 mutaciones de origen humano asociadas al desarrollo de este padecimiento (3 en la APP y 2 en PSN1), por lo que a edades tempranas pueden encontrarse placas amiloides, gliosis, marcadores sinápticos reducidos, pérdida neuronal y deterioro cognitivo<sup>31</sup>. Los animales fueron sexados y genotificados alrededor de los 21 días de nacidos, posteriormente, a las ocho semanas de edad se comenzó con la administración vía oral de los diferentes tratamientos, la cual se continuó diariamente durante 24 semanas consecutivas. Alrededor de las 32 semanas,

los animales fueron sometidos a diversas pruebas conductuales, posteriormente, fueron sacrificados para la obtención del tejido cerebral.

Todos los procedimientos siguieron con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-zoo-1999. El comité de bioseguridad y ética institucional aprobó todos los experimentos con animales descritos en el presente trabajo bajo el número de proyecto R-2016-1702-7.

5.2.- Laberinto Acuático de Morris: Se utilizó una tina circular blanca hecha de fibra de vidrio, con un diámetro de 150 cm y una altura de 60 cm, la cual fue llenada con agua teñida de blanco (dióxido de titanio) hasta un 80% de su capacidad. La tina se dividió de forma imaginaria en 4 cuadrantes iguales y en uno de ellos (noroeste -NO-) se colocó una plataforma circular de 15 cm de diámetro, quedando 1 cm por debajo del nivel del agua. La prueba se divide en dos fases, adquisición y evaluación de memoria. El periodo de adquisición tuvo una duración de 5 días, durante los cuales los ratones fueron colocados diariamente dentro del agua a partir de 4 puntos diferentes norte, oeste, sur y este (N, O, S y E); y se les permitió explorar libremente durante 90 segundos o hasta que lograban llegar a la plataforma. La latencia de llegada a la plataforma fue registrada. La evaluación de memoria se llevó a cabo 72 horas después del último día de adquisición; para lo cual la plataforma fue retirada y los animales se colocaron nuevamente dentro de la tina en cada uno de los 4 puntos de inicio. La latencia al primer cruce en la zona donde se encontraba anteriormente la plataforma (zona de la plataforma- ZP) fue registrada.

5.3.- Suspensión por la cola: Se utilizaron cajas de suspensión por la cola (SC) con el fin de evitar que los animales se vieran o interactuaran entre sí. Las dimensiones en cada espacio son de 29 X 23 cm, permitiendo que, al suspender al animal, éste no pueda hacer contacto con las paredes. Los ratones se suspendieron individualmente en el centro del compartimiento que le corresponde fijando su cola por su parte distal con cinta adhesiva en una varilla de madera fija a 50 cm del suelo. El tiempo de inmovilidad se cuantificó.

5.4.- Campo abierto: Consiste en una plataforma de acrílico, con base negra de 30 X 30 cm y paredes transparentes de 15 cm de alto. La base de esta plataforma se encuentra dividida en 9 cuadrantes imaginarios iguales. Para la prueba se colocaron los ratones en el cuadrante del centro y se les permitió explorar de forma libre durante 5 minutos, durante este tiempo se cuantificó el número de cruces entre cuadrantes como parámetro de actividad motriz y levantamientos verticales como parámetro de exploración.

#### 5.5.- Perfusión y corte de cerebros.

Los animales fueron anestesiados con una combinación de Ketamina clorhidrato (577mg/kg) y Xilacina clorhidrato (500 mg/kg) inyectada de forma intraperitoneal. Posteriormente se realizó un corte a la altura del esternón y se buscó dejar expuesto el corazón, se realizó un corte en la aurícula derecha y se pinchó el ventrículo izquierdo con la aguja conectada a una bomba peristáltica para perfundir solución salina por 15 minutos. Al finalizar este tiempo se comenzó a perfundir con paraformaldehído al 4% por 15 minutos más. Se colectó el cerebro cuidando no dañarlo y se colocó en paraformaldehído al 4% durante tres días, posteriormente se cambió esta solución por sacarosa al 30% y se almacenó a 4°C. A partir de estos tejidos se obtuvieron cortes sagitales de 30 micras de grosor mediante un criostato, para obtener rebanadas en flotación, las cuales se almacenaron en sacarosa al 30% a 4°C hasta su uso.

#### 5.6.- Tinción de Tioflavina-S:

Las muestras perfundidas de cerebros fueron teñidos con Tioflavina-S, el cual es un colorante utilizado para visualizar agregados de proteínas mal plegadas como lo son las placas del péptido  $\beta$ -amiloide. Para esto; se utilizaron cortes sagitales de 30 micras de grosor de cerebros de cada grupo, fueron teñidos con Tioflavina-S al 1% durante cinco minutos. Posteriormente, se lavaron en etanol al 80%, seguido por etanol al 70% y agua destilada. Los cortes teñidos, fueron montados con "fluoroshield" y cubiertos con un cubreobjetos. Los cortes teñidos se observaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop usando un espectro de emisión de 550 nm. Las imágenes obtenidas se analizaron en las zonas de subículo y corteza prefrontal mediante el software Image J. Se determinó el número promedio de placas, su tamaño promedio y el área total teñida.

#### 5.7.- Tinción de Tioflavina-S en conjunto con inmunofluorescencia:

En cortes de cerebros de cada grupo se realizó la tinción con Tioflavina-S como se describe anteriormente. A continuación, las rebanadas de tejido se incubaron en la solución de bloqueo durante 1 hora y posteriormente en anticuerpo primario durante toda la noche. Se realizaron lavados en PBS-T, se incubó en anticuerpo secundario durante 2 horas y se lavaron nuevamente con PBS-T. Los cortes fueron montados con "fluoroshield" y cubiertos con un cubreobjetos. Se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal Olympus

FV1000 Invertido en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y un rango de captura de 505 a 525 nm (verde) para observar la tinción de Tioflavina-S y una longitud de onda de excitación de 543 nm y un rango de captura de 560 a 660 nm (rojo) para observar la inmunofluorescencia contra Iba1. Las imágenes se obtuvieron con una captura en forma secuencial de la zona de hipocampo y corteza prefrontal y se analizaron mediante el software Image J. Se determinó, el número promedio de placas, su tamaño promedio y el porcentaje total de área teñida; así como una descripción de la morfología de la microglía encontrada de forma adyacente a las placas de  $\beta$ -amiloide.

#### 5.8.- ELISA:

A partir de extractos proteicos de cerebro, se realizó el método de Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el cual permite la cuantificación de un antígeno de interés mediante la unión de un anticuerpo marcador que puede medirse mediante una reacción enzimática asociada a un segundo anticuerpo. El protocolo se realizó de acuerdo a lo indicado por el proveedor del Kit para medir IL-1 $\beta$  (ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-1 $\beta$ , BioLegend, Cat. 432604) y TNF- $\alpha$  (ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-1 $\beta$ , BioLegend, Cat. 432604, ELISA MAX Deluxe Set Mouse TNF- $\alpha$ , BioLegend, Cat. 430904).

#### 5.9.- qPCR:

El RNA del hipocampo de los ratones tratados fue aislado como se ha descrito anteriormente<sup>60-62</sup>. Brevemente, el tejido fue sonicado en Trizol-reagent (Thermo Fisher Scientific), se añadieron dos volúmenes de cloroformo, se eliminaron los restos de tejido mediante centrifugación a 14,000 RFC (x g) por 15 minutos a 4°C, descartando el pellet formado y recuperando la fase acuosa. Se adicionaron 0.5 volúmenes de isopropanol; se incubó la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 18,000 RFC (x g) por 10 minutos. El RNA total formó una pastilla, la cual se recuperó y lavó con etanol al 70%; finalmente, se recuperó nuevamente el RNA por centrifugación y se resuspendió en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). La integridad del RNA total se verificó en un gel de agarosa al 1% en TBS y se determinó su concentración utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) a una longitud de onda de 260 nm.

La transcripción inversa de RNA a DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo usando la polimerasa M-MLV RevertAid transcriptase (Thermo Fisher Scientific). La

reacción se realizó en pasos con un volumen final de 20  $\mu$ l. Como primer paso, se realizó una mezcla de 500 ng de RNA, 25  $\mu$ g/ml de Oligonucleotidos desoxitimina (Oligos dT) y 0.5 mmol/L de dNTPs en un volumen de 15.5  $\mu$ l con agua tratada con DEPC y se incubó a 65°C durante 5 minutos para permitir que los oligos se alinearan (Oligo dT). Posteriormente, la mezcla se colocó en hielo momentáneamente y se agregó una mezcla de buffer RT 5X y 0.5  $\mu$ l de M-MLV RT en un volumen de 4.5  $\mu$ l. Por medio de un termociclador, la mezcla se mantuvo durante 60 minutos a 37°C seguido de 15 minutos a 70°C; posteriormente se adicionó agua tratada con DEPC a un volumen final de 200  $\mu$ l.

La qPCR se llevó a cabo con la sonda fluorescente SYBR Green/ROX qPCR Mastermix (Thermo Fisher scientific). Cada mezcla de reacción de qPCR contenía 2.5 ng de cDNA (1  $\mu$ l de la mezcla de RT), 5  $\mu$ l de la sonda fluorescente SYBR Green y 0.5  $\mu$ M de cada uno de los oligos específicos en un volumen final de 10  $\mu$ l con agua libre de RNAsas. Los genes de interés a analizar fueron trem2, tyrobp (MR), CxCr3, y como genes de referencia actina y CD45. Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C de activación inicial, seguido de 40 ciclos de amplificación (15 s a 95°C, 30 s a 60°C) y finalmente 1 ciclo de incremento de temperatura de 60°C hasta 95°C. Las mezclas de reacción se realizaron por duplicado para cada muestra. La expresión relativa fue calculada con respecto a actina usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 5.10.- Ensayo en macrófagos RAW-Blue:

Línea celular comercial RAW-Blue (InvivoGen, San Diego, CA, USA), cuenta con la integración cromosómica de un gen reportero que codifica para una fosfatasa alcalina que se secreta al medio de cultivo en respuesta a la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP1. Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fueron expuestas a LPS como estímulo pro-inflamatorio, junto con los diferentes tratamientos a evaluar o controles, y se incubaron durante 12 horas. Posteriormente, se tomó una muestra del medio a partir de la cual se midieron los niveles de fosfatasa alcalina secretada al medio, mediante un ensayo colorimétrico con QUANTI-Blue (InvivoGen, San Diego, CA, USA), según las recomendaciones del proveedor.

#### 5.11.- Determinación de CE<sub>50</sub>:

La Determinación de la CE<sub>50</sub> se realizó mediante la obtención de una regresión lineal de curvas dosis-respuestas obtenidas para cada compuesto y las fórmulas  $E_{max} = 1/b$  y  $CE_{50} = m * E_{max}$ . Las concentraciones utilizadas para la construcción de curvas de



concentración-respuesta fueron: en el caso de la Esc, con un peso molecular de 192.16 g/mol, 0.33, 1.6, 8.32, 41.63, 83.26 y 124.89  $\mu\text{M}$ ; para Tili, con un peso molecular de 594.5 g/mol, 0.08, 0.4, 2.0, 10.09, 50.46  $\mu\text{M}$ ; para el AU, con un peso molecular de 456.70 g/mol, 2.14, 6.48, 19.26, 38.53, 58.24 y 87.36  $\mu\text{M}$ ; para el AO, con un peso molecular de 456.70 g/mol, 6.48, 19.26, 38.53, 58.24, 87.36 y 116.4  $\mu\text{M}$  y para el MpDau, con un peso molecular de 576.85 g/mol, 8.66, 17.33, 21.66, 26.0, 30.33 y 34.67  $\mu\text{M}$ ;

5.12.- Análisis por desplazamiento de la curva: Se evaluó el efecto farmacológico de un compuesto a diferentes concentraciones; posteriormente se observó la misma curva de concentración-efecto agregando un segundo compuesto a una concentración fija y se comparó el comportamiento de ambas curvas para determinar si existe interacción farmacológica.

5.13.- Análisis isobolográfico: Con base a las  $\text{CE}_{50}$  determinada para cada compuesto individualmente, se calcularon las concentraciones de dos compuestos para que combinados resultaran en un efecto teórico del 50% ( $\text{CE}_{50}$  teórica de la combinación). Estas mezclas se evaluaron en la línea celular RAW-Blue y se calculó la  $\text{CE}_{50}$  experimental de la combinación, la cual fue compararla con la  $\text{CE}_{50}$  teórica, para determinar si dicha mezcla posee una interacción subaditiva, aditiva o sinérgica.

5.14.- Acoplamiento molecular:

Se realizó un análisis de acoplamiento molecular *in silico*, el cual permite predecir computacionalmente la orientación más favorable de interacción entre un ligando y un blanco. Se modeló la interacción de Esc con los receptores nicotínicos de acetilcolina  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  en diferentes sitios de unión; y MpDau con el receptor de estrógenos  $\alpha$  ( $\text{ER}\alpha$ ); y los receptores de hormona tiroidea  $\alpha$  ( $\text{THR}\alpha$ ) y  $\beta$  ( $\text{THR}\beta$ ). Las estructuras proteicas fueron obtenidas a partir de la base de datos PDB (*protein data bank*; 6USF y 6UR8 para el  $\alpha 4\beta 2$ ; 2PGZ para el  $\alpha 7$ ; 2IOG para el  $\text{ER}\alpha$ ; 3ILZ para el  $\text{THR}\alpha$  y 6KKB para el  $\text{THR}\beta$ ), mientras que las de los ligandos se obtuvieron en la base de datos ZINC. Se utilizó el programa de acoplamiento molecular AutoDockFR (ADFR), con un total de 1000 experimentos por cada ligando o sitio. Se obtuvo la energía de unión como parámetro de afinidad.

## **6.- RESULTADOS**

### **6.1.- Evaluación de la fracción MpF10 en un modelo murino de la EA**

Como primera parte del proyecto se evaluó el efecto neuroprotector de la MpF10 en un modelo murino de la EA. Para esto, se utilizaron ratones 5XFAD y su contraparte silvestre (wild type -WT-), los cuales fueron administrados con la MpF10, el MpDau, el vehículo (tween 1%) o el MpHA según el grupo correspondiente (Fig.2 A). Después de 24 semanas de administración, alrededor de los ocho meses de edad; a los ratones se les evaluó el aprendizaje, la memoria, el comportamiento tipo depresión, y la actividad motora y exploratoria mediante diversas pruebas conductuales. Finalmente, se obtuvieron las muestras biológicas para su posterior análisis (Fig. 2 A).

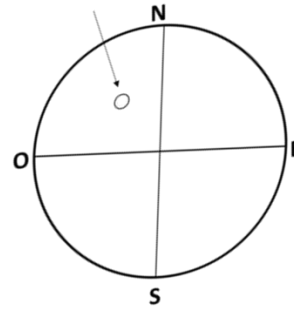
#### **6.1.1.- Efecto de la MpF10 sobre el aprendizaje y la memoria en un modelo murino de la EA**

Para evaluar el aprendizaje y la memoria de los animales, se aplicó la prueba de LAM, la cual se divide en dos fases; aprendizaje y evaluación de la memoria. Durante la fase de aprendizaje, los animales son entrenados para encontrar una plataforma de escape y se espera que, estando sanos, aprendan su ubicación y tarden cada vez menos en encontrarla. De forma contraria, los animales con el proceso de aprendizaje alterado deberían tardar más en encontrar la plataforma o posiblemente no lograrlo. Se observó que similar a lo anteriormente reportado, a los animales 5XFAD les toma más tiempo localizar la plataforma comparados con los animales WT, lo que nos indica que su proceso de aprendizaje se encuentra alterado. Sin embargo, podemos ver que la administración de MpF10 (10 µg/kg) y MpDau (2 µg/kg) revierten este déficit, recapitulando lo observado al administrar MpHA (50 µg/kg; Fig. 2 B y C).

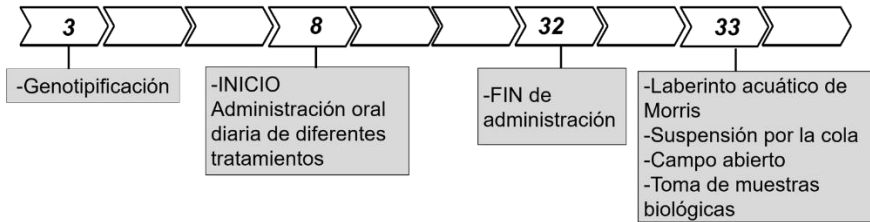
A)

**Grupos experimentales**

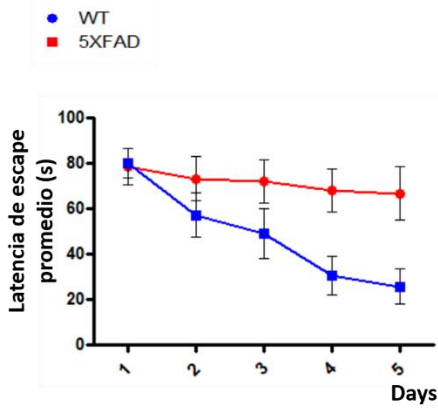
Grupo	Genotipo	Tratamiento
1	WT	Vehículo
2	5XFAD	
3	WT	MpF10 (10 mg/kg)
4	5XFAD	
5	WT	MpDau (2 mg/kg)
6	5XFAD	
7	WT	MpHA (50 mg/kg)
8	5XFAD	



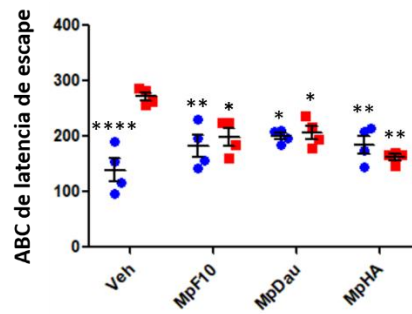
**Tiempo (Semanas)**



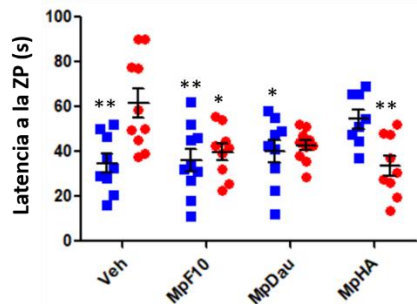
B)



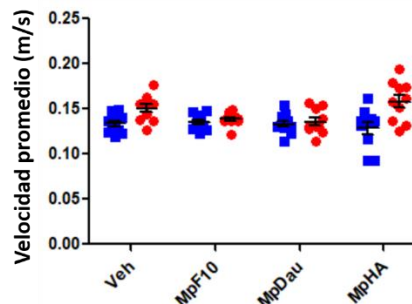
C)



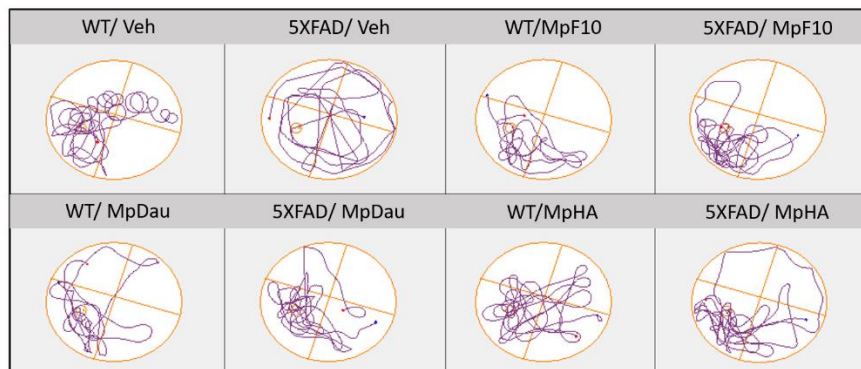
D)



E)



F)



**Figura 2. Efecto de la fracción 10 de *M. parviflora* y daucosterol sobre la capacidad de aprendizaje y memoria en ratones 5XFAD. A)** Tabla de grupos experimentales: WT con vehículo (WT/Veh;  $n=9$ ), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh;  $n=10$ ), WT con fracción 10 (WT/MpF10;  $n=10$ ), 5XFAD con fracción 10 (5XFAD/MpF10;  $n=9$ ), WT con daucosterol (WT/MpDau;  $n=9$ ), 5XFAD con daucosterol (5XFAD/MpDau;  $n=9$ ), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA;  $n=8$ ), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA;  $n=9$ ) y esquema temporal de diseño experimental y esquema de tina utilizada para realizar la prueba de laberinto acuático de Morris (LAM). **B)** Tiempo (s) necesitado para llegar a la plataforma de escape (latencia de escape) durante los cinco días de aprendizaje de los grupos control. **C)** Área bajo la curva de las latencias de escape de los diferentes grupos durante el periodo de aprendizaje. **D)** Latencia a la zona de la plataforma durante la evaluación de memoria. **E)** Velocidad promedio de nado. **F)** Mapas de recorrido representativos de cada grupo. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Tukey.  $*p \leq 0.05$ ;  $**p \leq 0.01$ ;  $***p \leq 0.0001$  vs. 5XFAD administrado con el vehículo (Veh).

Posteriormente, durante la prueba de memoria, la plataforma de escape se retiró y se permitió a los animales explorar la tina de forma libre. Su comportamiento fue videograbado y se analizó el tiempo de latencia a la zona donde anteriormente se encontraba la plataforma (ZP). En la prueba se observó que, en comparación con los ratones WT, los animales 5XFAD tardaron significativamente más tiempo a la ZP, lo que se revirtió con la administración de MpF10, MpDau o MpHA (Fig. 2 D). Sumado a lo anterior, a partir de los videos adquiridos se obtuvieron mapas de los recorridos hechos por los animales, en los que se pudo observar que los ratones WT, tenían un patrón de nado que se acercaba a la ZP, a diferencia de los ratones 5XFAD, cuyo recorrido fue más errático. Sin embargo, los animales 5XFAD administrados con MpF10, MpDau o MpHA, corregían este patrón, dirigiéndolo a la ZP (Fig. 2 F). Finalmente, dentro de esta prueba se determinó la velocidad promedio de nado de los animales evaluados para descartar que las conclusiones sobre aprendizaje y memoria fueran afectadas por una disfunción en la capacidad de nado de los animales; no observando diferencias significativas entre los grupos (Fig. 2 E).

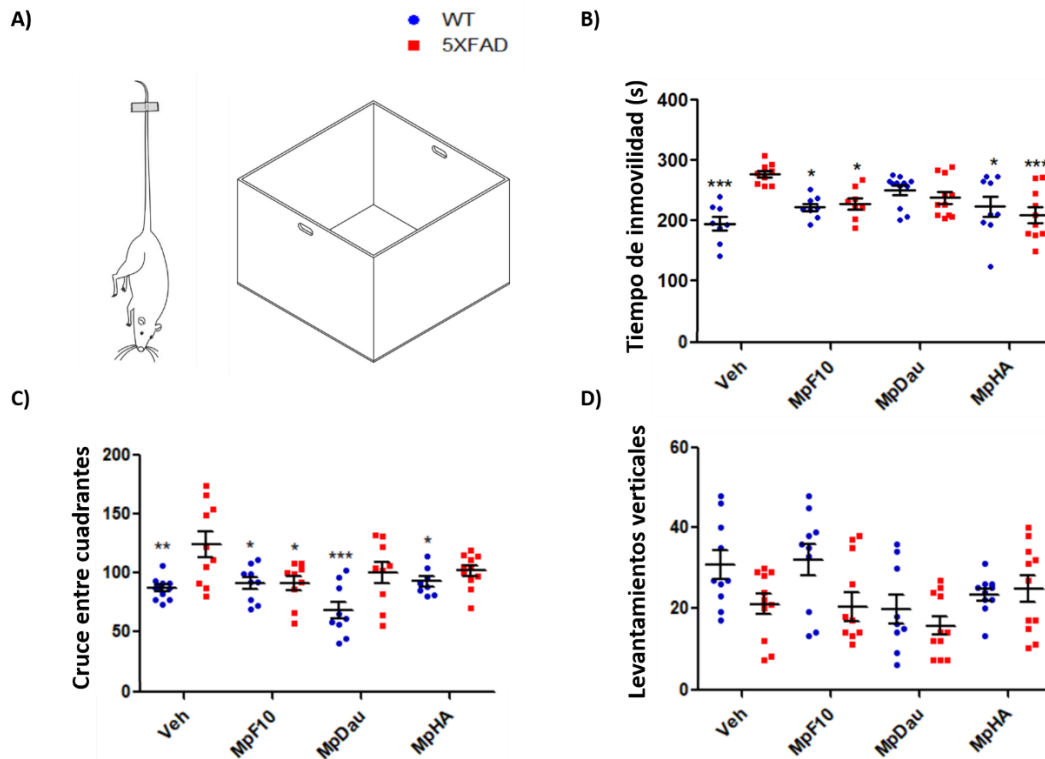
### **6.1.2.- Efecto de la MpF10 sobre el comportamiento tipo depresión, y la actividad motora y exploratoria en un modelo murino de la EA**

Adicional a la evaluación de aprendizaje y memoria, los animales fueron sometidos a pruebas conductuales para evaluar un comportamiento tipo depresión (suspensión por la cola) y su actividad motora y exploratoria (campo abierto; Fig. 3).

La evaluación de comportamiento tipo depresión se llevó a cabo a través de la prueba de SC. En esta prueba, se somete al animal a una situación adversa de la cual no es capaz de salir y se determina el tiempo en el que se mantiene en movimiento o inmóvil (Fig. 3 A). Un mayor tiempo de inmovilidad indica un comportamiento tipo depresión, ya que representa que el animal entra en un estado de desesperanza y deja de intentar salir de la situación en la que se encuentra. Para dicho parámetro, se encontró un aumento en los ratones 5XFAD, indicando una mayor desesperanza. Sin embargo, los animales 5XFAD administrados con MpDau mostraron una tendencia a disminuir este tiempo, disminución que fue significativa cuando el tratamiento utilizado fue la MpF10 o el MpHA, alcanzando valores similares a los observados con los animales WT (Fig. 3 B).

Por otro lado, para evaluar la actividad motora y de exploración, se utilizó la prueba de campo abierto, donde los animales son colocados en una plataforma y se observa su comportamiento. La plataforma se encuentra dividida en nueve cuadrantes imaginarios y el parámetro medido para evaluar actividad motora fue el número de cruces entre estos. Los animales 5XFAD mostraron un aumento en el número de cruces en comparación a los animales WT, lo que nos indica una mayor actividad motora. Este efecto se revertió de forma significativa con la administración de la MpF10 y con una tendencia a disminuir para el caso de MpDau y el MpHA (Fig. 3 C). Por otro lado, se evaluó la cantidad de levantamientos verticales como parámetro de exploración, cuyo número fue menor en los animales 5XFAD en comparación con los WT, indicándonos que la exploración de los primeros se encuentra inhibida; conducta que no parece ser modificada por la administración de la MpF10, a diferencia de lo observado al administrar MpDau o el MpHA, los cuales disminuyen el número de levantamientos verticales en los animales WT (Fig. 3 D). Dichos resultados en conjunto nos indican que los animales 5XFAD tienen una actividad motora exacerbada que no involucra un aumento en la exploración o curiosidad de los animales, pero que este exceso de actividad se normaliza con la administración de cualquiera de los tratamientos utilizados. Sin embargo, la administración de los

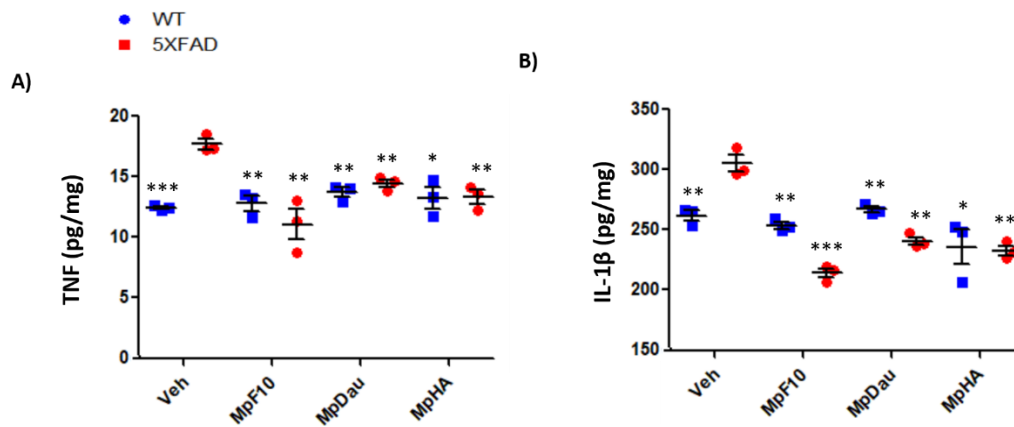
tratamientos no regula la actividad exploratoria en los animales 5XFAD, quienes se mantienen con un número de levantamientos verticales disminuidos respecto a los animales WT.



**Figura 3. Efecto de la fracción 10 de *M. parviflora* y daucosterol sobre el comportamiento tipo depresión y actividad motora y exploratoria en animales 5XFAD.** Grupos: WT con vehículo (WT/Veh), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh), WT con fracción 10 (WT/MpF10), 5XFAD con fracción 10 (5XFAD/MpF10), WT con daucosterol (WT/MpDau), 5XFAD con daucosterol (5XFAD/MpDau), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA). **A)** Esquema de la prueba de suspensión por la cola y campo abierto mediante las cuales se evaluó comportamiento tipo depresión y actividad motora y exploratoria. **B)** Tiempo de inmovilidad (s) en prueba de suspensión por la cola. **C)** Número de cruces entre cuadrantes y **D)** Número de levantamientos verticales en prueba de campo abierto. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Tukey. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$  vs. 5XFAD administrados con el vehículo (Veh).

### 6.1.3.- Efecto de la MpF10 sobre los niveles de TNF e IL-1 $\beta$ en cerebro en un modelo murino de la EA

Posterior a la evaluación conductual, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras biológicas a partir de las cuales se exploró la correlación entre los cambios conductuales observados y el estado inflamatorio en el cerebro de los ratones utilizados. Para ésto, se midieron en cerebro, los niveles proteicos de dos citocinas importantes en procesos de inflamación, TNF e IL-1 $\beta$  (Fig. 4). Se observó que en los animales 5XFAD, los niveles de ambas citocinas se encontraban elevados; sin embargo, éstos disminuían al administrar la MpF10, el MpDau o el MpHA (Fig. 4 A y B). Indicando una capacidad antiinflamatoria por parte de los diferentes tratamientos y una posible vía a nivel celular, a través de la cual ejercen su efecto en memoria y aprendizaje.

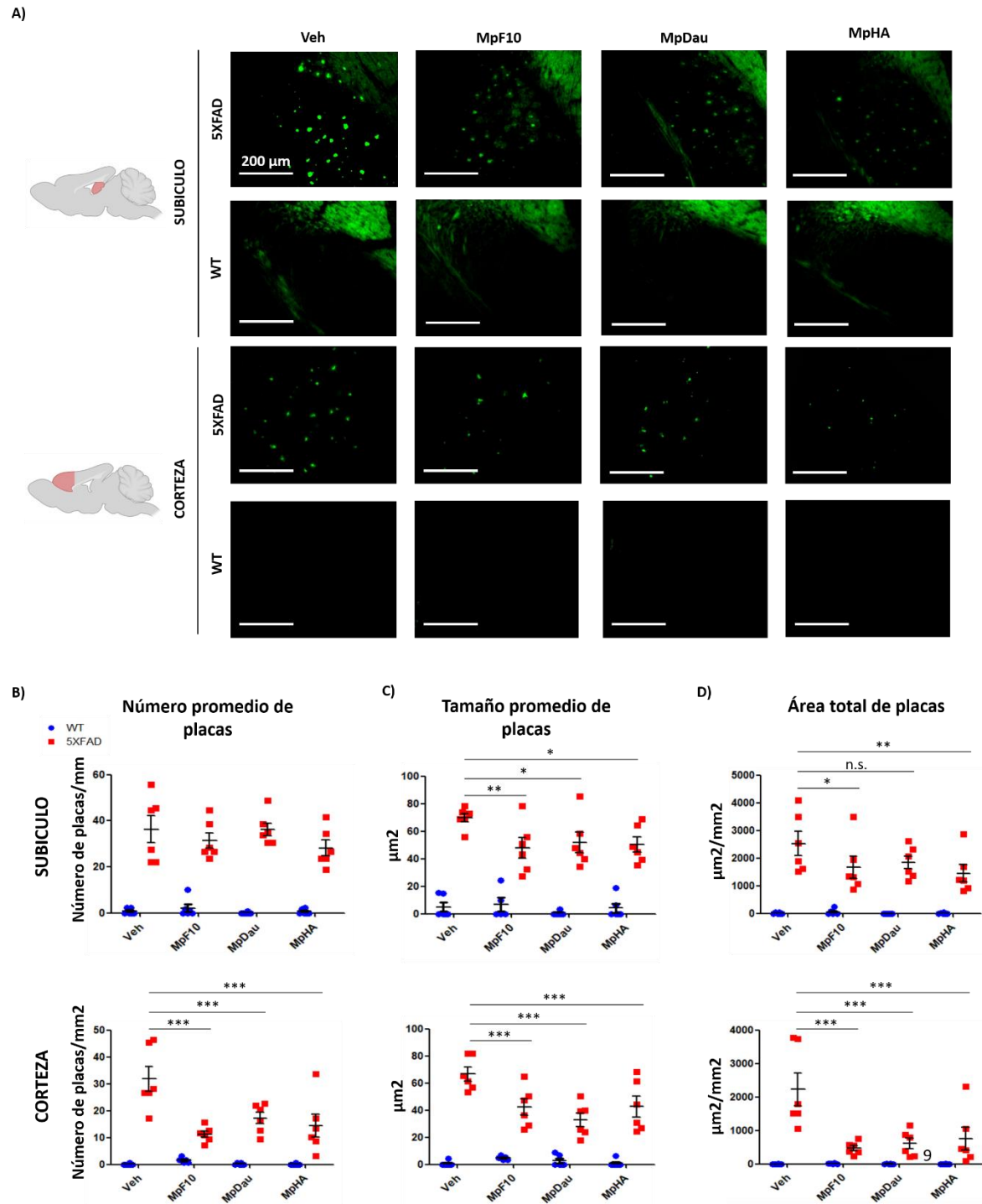


**Figura 4. Efecto de la fracción 10 de *M. parviflora* y daucosterol sobre los niveles de TNF e IL-1 $\beta$  en ratones 5XFAD.** Grupos: WT con vehículo (WT/Veh), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh), WT con fracción 10 (WT/MpF10), 5XFAD con fracción 10 (5XFAD/MpF10), WT con daucosterol (WT/MpDau), 5XFAD con daucosterol (5XFAD/MpDau), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA). **A)** Niveles TNF y de **B)** IL-1 $\beta$  determinados por ELISA en tejido de cerebro. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Bonferroni \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$  vs. 5XFAD administrados con el vehículo (Veh).

#### **6.1.4.- Efecto de la MpF10 sobre la presencia del péptido $\beta$ - amiloide en un modelo murino de la EA**

Las placas de  $\beta$ - amiloide son una de las principales marcas histopatológicas de la EA, y dentro del modelo utilizado se presentan desde edades tempranas, por lo que evaluamos su presencia en los animales tratados para determinar si la MpF10 y el MpDau modulan su deposición; ésto se hizo a través de la tinción con Tioflavina-S. Observamos que los animales 5XFAD presentan un mayor número de placas amiloideas y de mayor tamaño en corteza prefrontal y subículo, dos áreas importantes en procesos de aprendizaje y memoria (Fig. 5). Sin embargo, descubrimos que la administración de MpF10, MpDau, o de MpHA, disminuyeron el tamaño de las placas tanto en corteza como en subículo (Fig. 5 C), así como el número de placas amiloideas en el caso de la corteza prefrontal (Fig. 5 B); disminuyendo de esta forma el área total ocupada por las placas amiloideas en estas zonas (Fig. 5 D).





**Figura 5. Efecto de la fracción 10 de *M. parviflora* y daucosterol sobre la deposición del péptido  $\beta$ -amiloide en ratones 5XFAD.** Grupos: WT con vehículo (WT/Veh), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh), WT con fracción 10 (WT/MpF10), 5XFAD con fracción 10 (5XFAD/MpF10), WT con daucosterol (WT/MpDau), 5XFAD con daucosterol (5XFAD/MpDau), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA). **A)** Imágenes representativas de tinciones con Tioflavina-S en subículo y corteza (línea de escala, 200  $\mu\text{m}$ ). **B)** Número y **C)** tamaño

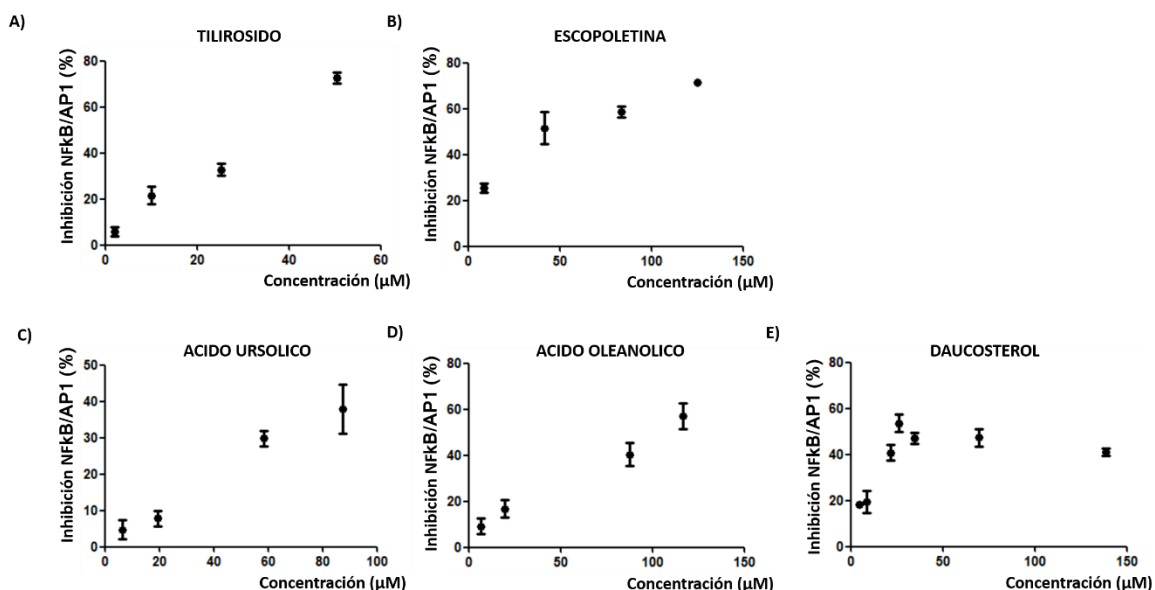
promedio de placas. **D)** Área total cubierta por placas determinado mediante análisis con el software Image J. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Tukey \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$  vs. 5XFAD administrados con el vehículo (Veh).

## **6.2.- Efecto anti-inflamatorio e interacciones farmacológicas de 5 compuestos de *M. parviflora* sobre la línea celular RAW-Blue**

Una vez que confirmamos el efecto neuroprotector de la MpF10 y el MpDau en un contexto de la EA; buscamos diseñar un fármaco combinado con actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora, a partir de compuestos determinados presentes en *M. parviflora*. En este sentido y tomando en cuenta que al menos parte de la actividad neuroprotectora observada anteriormente con esta planta es dada por la modulación en el estado de activación de la microglía, se utilizó la línea celular de macrófagos RAW-Blue, un modelo que mide inflamación de manera rápida y sencilla, mediante un ensayo colorimétrico que cuantifica la activación de NF $\kappa$ B y AP 1, dos factores de transcripción importantes en procesos inflamatorios. Por lo que la utilización de las células RAW-Blue permite la evaluación de un gran número de condiciones diferentes en cortos periodos de tiempo. De esta forma, se determinaron algunas interacciones farmacológicas entre compuestos biológicamente activos presentes en *M. parviflora*.

Se seleccionaron 5 compuestos de *M. parviflora*, cuatro identificados en el MpHA (Esc, Tili, AO y AU) y uno identificado en la MpF10 (MpDau). Para establecer un rango de concentración en el cual evaluar las interacciones de los compuestos, se determinó la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) y el efecto máximo (Emax) para cada uno de los compuestos (Tabla 1). Esta valoración se llevó a cabo a través de curvas concentración-respuesta (Fig. 6). En las cuales, se observó un efecto dependiente de la concentración para todos los casos.

La CE<sub>50</sub> y el Emax se calcularon para cada uno de los compuestos y se presentan en la tabla 1.



**Figura 6. Curva dosis-respuesta de compuestos presentes en *M. parviflora*.** Porcentaje de inhibición de NFκB/AP1 en células RAW-Blue en cultivos tratados con diferentes concentraciones de **A)** tilirosido, **B)** escopoletina, **C)** ácido ursólico, **D)** ácido oleanólico o **E)** daucosterol.

**Tabla 1. Efecto máximo (Emax) y concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de cinco compuestos presentes en *M. parviflora* sobre células RAW-Blue.**

	Tili	Esc	AU	AO	MpDau
Emax (%)	75.75	73.52	38.31	52.63	52.91
CE <sub>50</sub> (μM)	24.12	15.82	47.25	30.78	9.34

Abreviaturas: Tilirosido (Tili), escopoletina (Esc), ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO), daucosterol (MpDau), efecto máximo (Emax) y concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>).

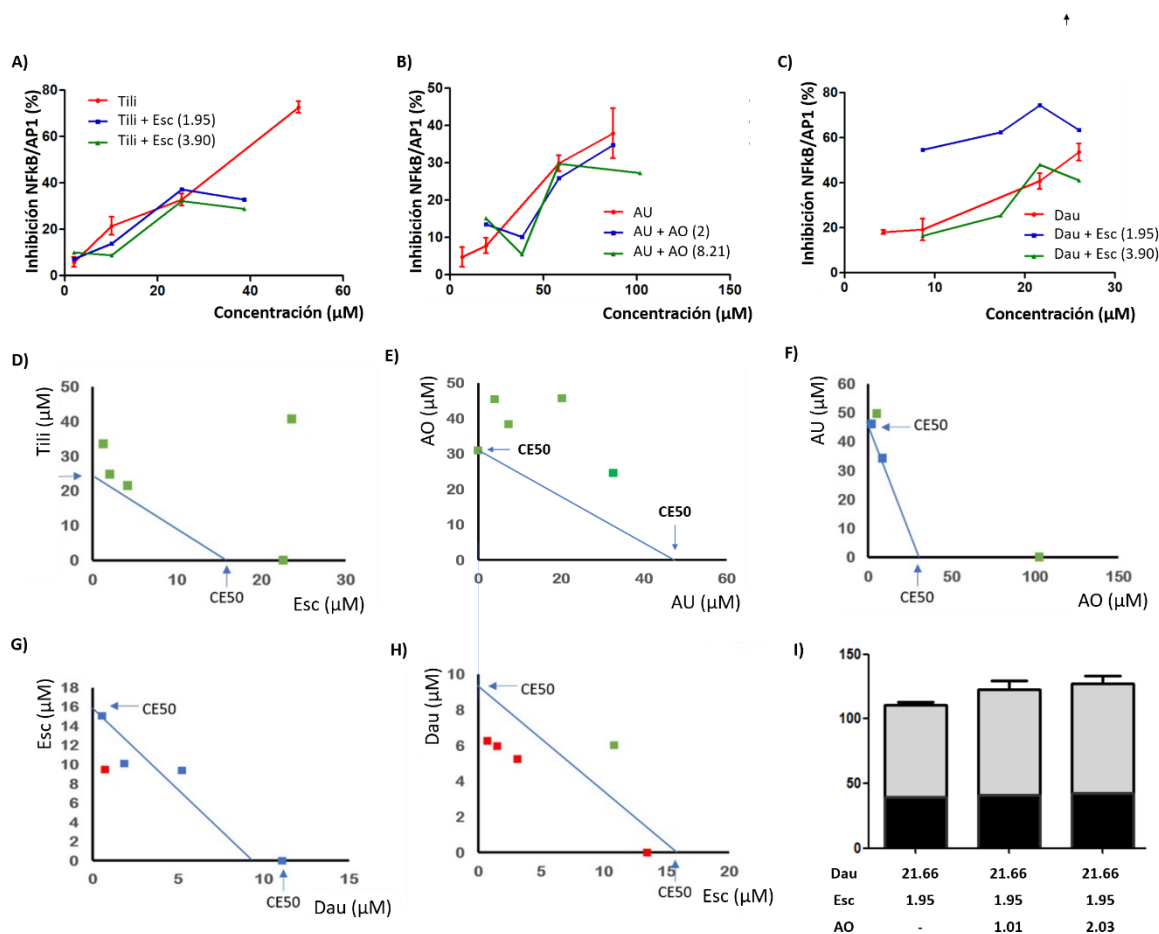
Con base en la CE<sub>50</sub> calculada para cada compuesto, se realizó la evaluación de las interacciones farmacológicas (Fig. 7). Con este fin, se formularon combinaciones de Tili más Esc, AU más AO o MpDau más Esc en un análisis de tipo desplazamiento de la curva (Fig. 7 A-C). Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones de uno de los compuestos y posteriormente se repitió dicha curva de concentración-respuesta añadiendo un segundo compuesto a una concentración fija. Las curvas obtenidas se compararon para determinar posibles interacciones farmacológicas entre los compuestos utilizados. Las combinaciones

compuestas por Tili más Esc o AU más AO no presentaron cambios, sin embargo, las compuestas por MpDau más Esc a 1.95  $\mu\text{M}$ , resultaron en un aumento en la curva de actividad respecto a MpDau de forma individual, lo que sugirió una interacción farmacológica positiva entre estos dos compuestos, con mayor efecto a 1.95  $\mu\text{M}$  de Esc más 21.66  $\mu\text{M}$  de MpDau, presentando un efecto de 74.3 % de inhibición de actividad de NF $\kappa$ B (Fig. 7 C).

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de tipo isoblograma donde se evaluaron mezclas de diferentes concentraciones entre cero y la  $\text{CE}_{50}$  de Tili más Esc, AU más AO o MpDau más Esc (Fig. 7 D- H). Con base en los resultados experimentales se calculó la  $\text{CE}_{50}$  de cada mezcla y se comparó con la  $\text{CE}_{50}$  teórica, obtenida por la sumatoria de la parte proporcional del efecto correspondiente a la concentración utilizada de cada compuesto, esto, basado en las curvas de efecto realizadas de forma individual.

El tipo de interacción se determinó como el coeficiente de la  $\text{CE}_{50}$  obtenida experimentalmente sobre la teórica, donde valores cercanos o iguales a 1, se consideran un efecto aditivo; valores por debajo de 1, representan un efecto subaditivo y valores mayores a 1, se consideran como efecto sinérgico. A partir de lo cual se determinó que la combinación de MpDau más Esc presentaba una interacción sinérgica (Fig. 7 G y H).

Tomando en cuenta todos estos resultados, y el efecto modulador sobre la microglía reportado anteriormente para el AO; a la combinación de 1.95  $\mu\text{M}$  de Esc más 21.66  $\mu\text{M}$  de MpDau se le agregó AO a 2 diferentes concentraciones (1.01 y 2.03  $\mu\text{M}$ ), obteniendo un efecto incluso mayor (Fig. 7 I).



**Figura 7. Efecto anti-inflamatorio de compuestos derivados de *M. parviflora* y su interacción farmacológica.** Interacción farmacológica entre **A)** tilirósido (Tili) y escopoletina (Esc), **B)** ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO), **C)** Esc y daucosterol (MpDau) bajo un esquema de desplazamiento de la curva. Interacción farmacológica entre **D)** Tili y Esc, **E)** y **F)** AU y AO, **G)** y **H)** Esc y MpDau bajo un esquema de isoblograma. **I)** Efecto observado contra el efecto predicho utilizando combinaciones entre MpDau, Esc y AO.

### 6.3.- Evaluación de dos combinaciones de compuestos presentes en *M. parviflora* en ratones 5XFAD

Con base en las concentraciones de Esc, MpDau y AO con las que se obtuvo un mejor efecto en la línea celular RAW-Blue, se propusieron dos combinaciones para la evaluación en el modelo murino de EA. La combinación 1 (C1) estuvo compuesta de 0.59 mg/kg de Esc y 2 mg/kg de MpDau; por otro lado, la combinación 2 (C2) estuvo conformada por 0.59 mg/kg de Esc, 2 mg/kg de MpDau y 0.073 mg/kg de AO (Fig. 8 A). Se formaron 10 grupos de acuerdo con el genotipo y al tratamiento a administrar, quedando i) wild type con vehículo (WT/Veh), ii) transgénico 5XFAD con vehículo (5XFAD/veh), iii) wild type con

combinación 1 (WT/C1), iv) transgénico 5XFAD con combinación 1 (5XFAD/C1), v) wild type con combinación 2 (WT/C2), vi) transgénico 5XFAD con combinación 2 (5XFAD/C2), vii) wild type con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), viii) transgénico 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA), ix) wild type con meloxicam (WT/Mel), x) transgénico 5XFAD con meloxicam (5XFAD/Mel- Fig. 8 B). A las 8 semanas de edad se comenzó con la administración vía oral de los diferentes tratamientos, la cual se continuó diariamente durante 24 semanas (Fig. 8 C).

### **6.3.1.- Efecto de dos combinaciones de compuestos presentes en *M. parviflora* sobre el aprendizaje y la memoria en un modelo murino de la EA**

A los animales se les evaluó aprendizaje y memoria a través de la prueba de LAM descrita anteriormente. Como se esperaba, los animales 5XFAD tardaron un mayor tiempo en encontrar la plataforma de escape durante el periodo de aprendizaje (adquisición) comparados con los WT, tiempo que se disminuyó de forma significativa cuando los animales fueron administrados con la C1, de forma similar a nuestro control interno de MpHA; no así con la C2 y el control Mel, los cuales no mostraron un cambio significativo (Fig. 8 D y E). Por otro lado, durante la prueba de memoria, los animales 5XFAD tardaron significativamente más tiempo en pasar por primera vez por donde anteriormente se encontraba la plataforma de escape en comparación con los WT, efecto que se vio revertido con la administración de C1 y los controles positivos de Mel o el MpHA; no así con la C2 (Fig. 8 F). Adicional a esto, a partir de los videos grabados durante la prueba de memoria, se obtuvieron mapas del recorrido hecho por cada animal, observando que los animales administrados con la C1, la C2 o los controles de Mel o MpHA, solían tener recorridos más dirigidos a la ZP (Fig. 8 H). Finalmente, se midió la velocidad promedio de nado en los animales evaluados para descartar que una dificultad motriz pudiera alterar los resultados en esta prueba, no encontrando cambios significativos entre ninguno de los grupos (Fig. 8 G).

### **6.3.2.- Efecto de dos combinaciones de compuestos presentes en *M. parviflora* sobre los niveles de IL-1 $\beta$ y TNF en cerebro en un modelo murino de la EA**

Posterior a la prueba de memoria, sabiendo que las combinaciones de compuestos evaluadas presentan un efecto anti-inflamatorio en el modelo con la línea celular RAW-Blue y que este podría mejorar el estado cognitivo en los animales tratados, se midieron los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF (Fig. 9). En el caso de IL-1 $\beta$ , sus niveles se encontraron elevados en los ratones 5XFAD en comparación con los WT, pero éstos se redujeron cuando los animales fueron administrados con la C1 o la C2, al igual que con nuestros controles de Mel o MpHA (Fig. 9 A). Por otro lado, TNF se encontró aumentada en los animales 5XFAD en comparación con los WT, lo cual disminuyó cuando se administró la C1 o los controles de Mel o MpHA; no así, al administrar la C2, cuyos niveles no tuvieron un cambio significativo en comparación con los animales 5XFAD administrados con vehículo (Fig. 9 B). Dichos resultados nos indican que, como ya ha sido reportado<sup>31,61,63,64</sup>, los animales 5XFAD desarrollaron un proceso inflamatorio en cerebro, el cual logra ser modulado por la C1 y los controles positivos Mel y MpHA.

### **6.3.3.- Efecto de dos combinaciones de compuestos presentes en *M. parviflora* sobre el estado de activación de la microglía en un modelo murino de la EA**

La microglía son células de origen mieloide con importantes funciones inmunes y fagocíticas, por lo que su fenotipo impacta de gran manera en procesos inflamatorios y neurodegeneración. Durante condiciones fisiológicas normales, este tipo celular se encuentra en un estado homeostático, sin embargo, al censar algún posible daño, estas células modifican su expresión genética y pueden encontrarse en diferentes estados de activación. Recientemente se ha descrito el estado de activación DAM (microglía asociada a enfermedad) de la microglía y se ha caracterizado su expresión genética a través de su transcriptoma en célula única<sup>65</sup>. A partir de ésta, se describieron dos fenotipos, donde el DAM-2 se encuentra asociado a una mayor capacidad fagocítica. Como marcadores del fenotipo DAM-2 se han identificado a Tyrobp y Trem2, los cuales son necesarios para una mejor fagocitosis y funcionamiento de este tipo celular<sup>65</sup>. En este contexto, a partir de tejido de cerebro de los animales tratados con la C1 o la C2, se midieron los niveles de transcrito de dos marcadores de DAM-2; Tyrobp y Trem2, y uno de microglía “homeostática”, CxCR3<sup>65,66</sup> (Fig. 10). En el caso de CxCR3 no se encontraron diferencias significativas

entre los niveles expresados por ninguno de los grupos (Fig. 10 A), sin embargo, para el caso de Trem2 y Tyrobp, ambos se encontraron significativamente elevados en los animales 5XFAD administrados con la C1 o con el MpHA (Fig. 10 B y C), indicando que al menos parte de la microglía se encuentra en un estado de activación de tipo DAM-2. Adicionalmente, dichas observaciones sugieren una mayor capacidad fagocítica por parte de ésta.

Sumado a lo anterior, se observaron los cambios en la morfología de la microglía en cerebros de los ratones 5XFAD tratados, a través de inmunofluorescencias contra IBA1, un marcador clásico y específico de este tipo celular. Donde en los ratones tratados con la C1 o el MpHA pudo observarse la presencia de microglía altamente ramificada, con procesos largos y delgados que se localizaban alrededor de las placas, características que coinciden con el fenotipo DAM-2<sup>65</sup>. Por otro lado, en los animales sin tratamiento, la microglía presentó cuerpos celulares más grandes y menos ramificaciones, morfología coincidente con el fenotipo ameboide de una activación clásica (Fig. 11).



**A)**

Esc (μM)	Dau (μM)	AO (μM)	Efecto esperado	Efecto Observado	Tipo de interacción
1.95	21.66	0	39.143	71.727 + 5.76	1.83/Sinérgica
1.95	21.66	2.03	42.610	84.984 + 12.96	1.99/Sinérgica

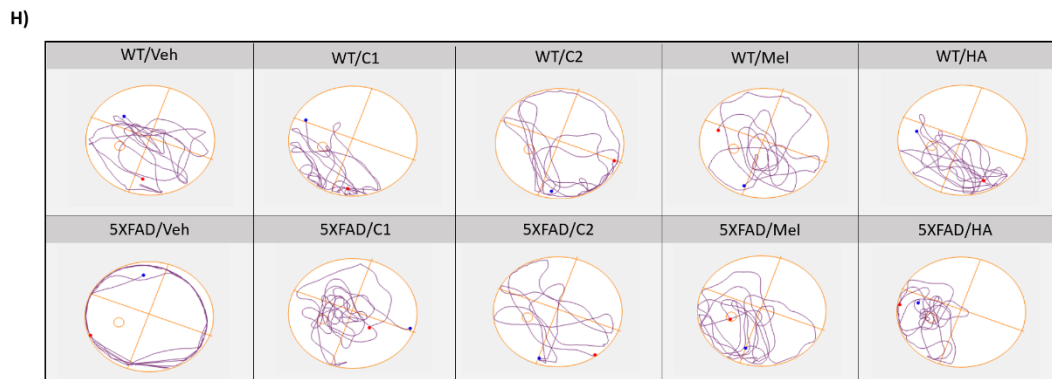
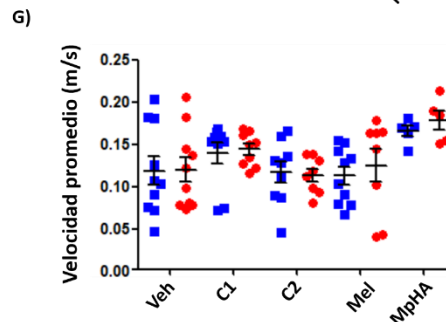
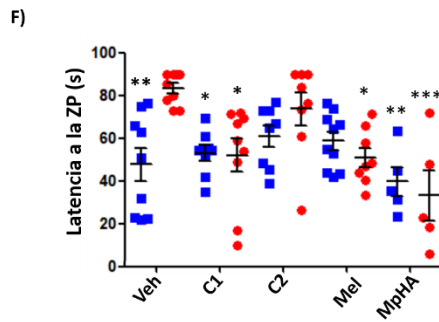
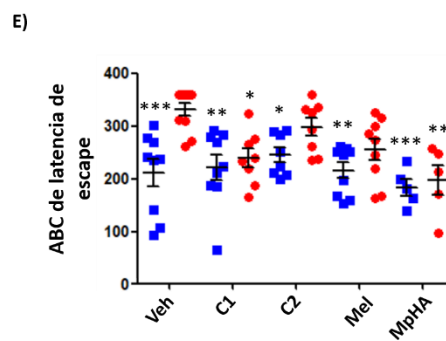
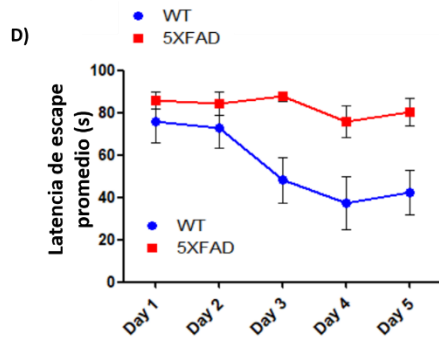
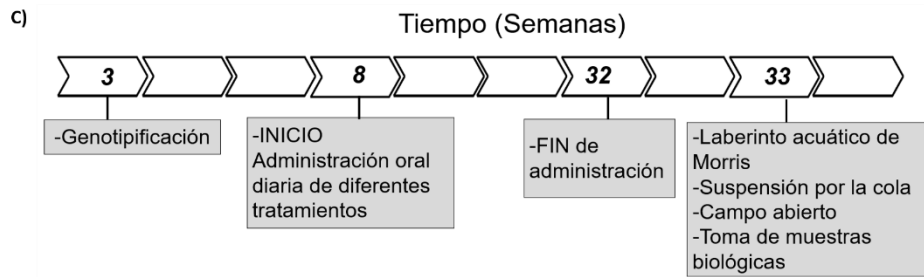
  

	Escopoletina (mg/kg)	Daucosterol (mg/kg)	Ácido Oleanólico (mg/kg)
C1	0.59	2	0
C2	0.59	2	0.073

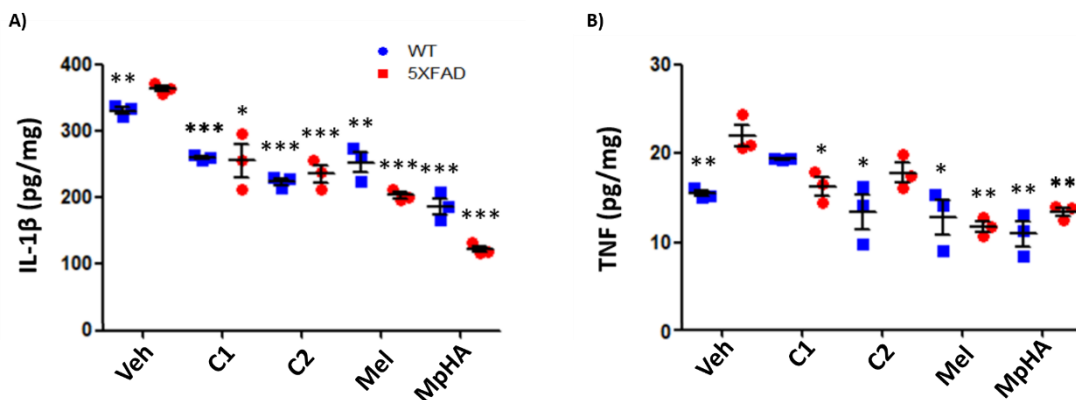
RAW Blue  
↓  
Ratones 5XFAD

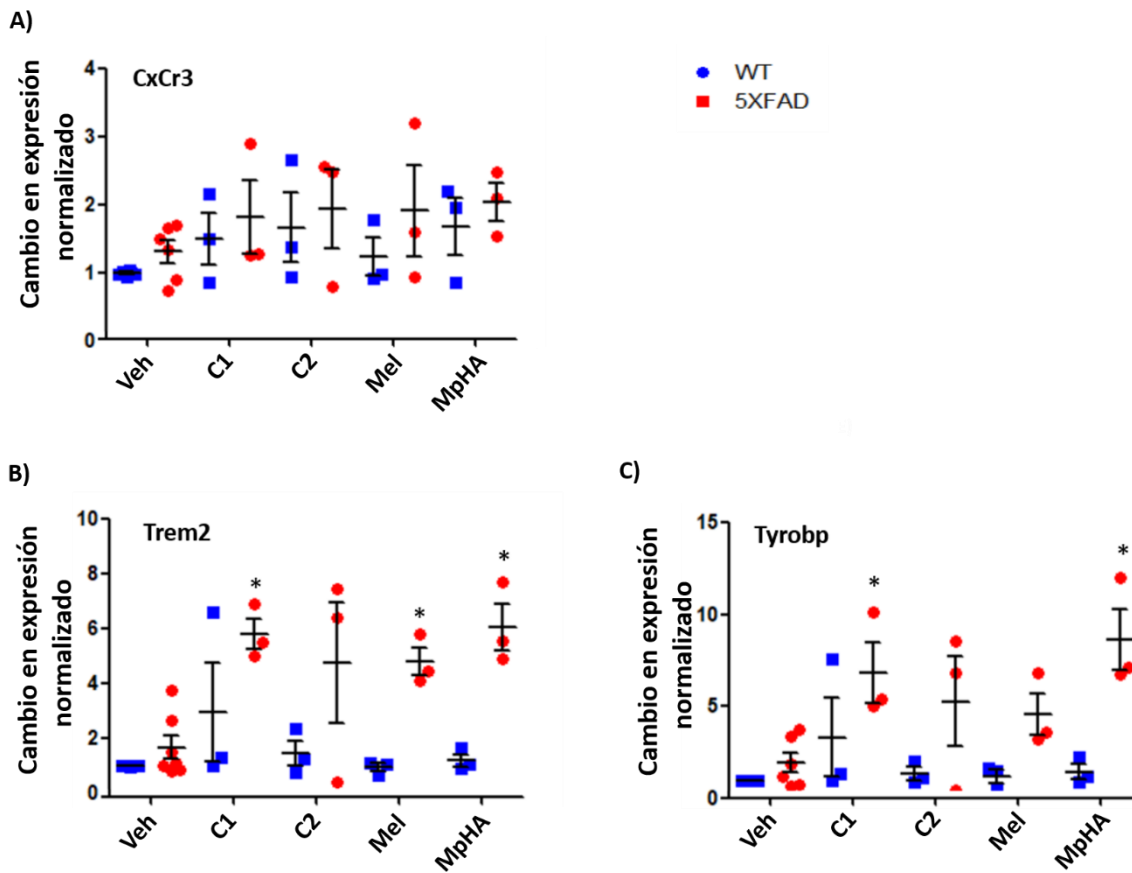
**B)**

Grupo	Genotipo	Tratamiento
1	WT	Vehículo
2	5XFAD	Vehículo
3	WT	Combinación 1 (C1)
4	5XFAD	
5	WT	Combinación 2 (C2)
6	5XFAD	
7	WT	Meloxicam (Mel)
8	5XFAD	
9	WT	MpHA
10	5XFAD	

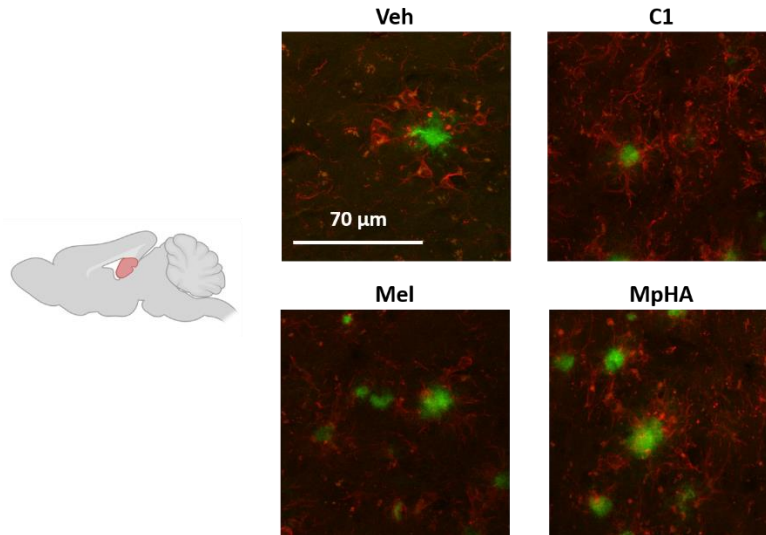


**Figura 8. Efecto de dos combinaciones de compuestos derivados de *M. parviflora* sobre la memoria y el aprendizaje en un modelo de la EA. A)** composición de las dos mezclas evaluadas en ratones 5XFAD. **B)** Tabla de grupos experimentales formados por WT con vehículo (WT/Veh;  $n=9$ ), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh;  $n=9$ ), WT con combinación 1 (WT/C1;  $n=9$ ), 5XFAD con combinación 1 (5XFAD/C1;  $n=9$ ), WT con combinación 2 (WT/C2;  $n=9$ ), 5XFAD con combinación 2 (5XFAD/C2;  $n=8$ ), WT con meloxicam (WT/Mel;  $n=10$ ), 5XFAD con meloxicam (5XFAD/Mel;  $n=8$ ), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA;  $n=5$ ), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA;  $n=5$ ). **C)** esquema temporal de diseño experimental. **D)** Latencia de escape (s) durante los cinco días de aprendizaje de los grupos control. **E)** Área bajo la curva de las latencias de escape de los diferentes grupos durante el periodo de aprendizaje. **F)** Latencia a la zona de la plataforma durante la evaluación de memoria. **G)** velocidad promedio de nado. **H)** Mapas de recorrido representativos de cada grupo. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Tukey  $*p \leq 0.05$ ;  $**p \leq 0.01$ ;  $***p \leq 0.001$  vs. 5XFAD administrados con el vehículo (Veh).





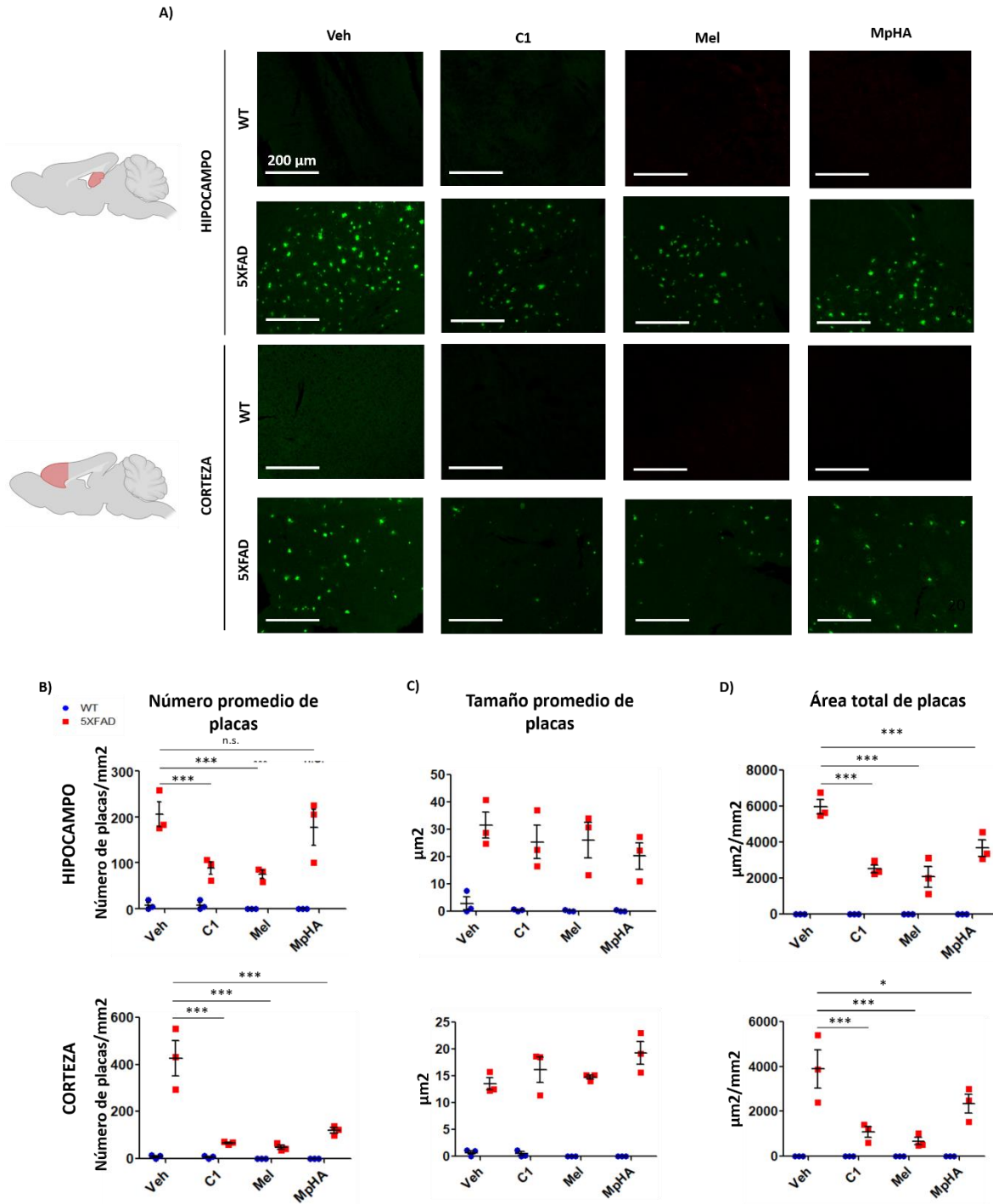
**Figura 10. Efecto de dos combinaciones de compuestos derivados de *M. parviflora* sobre el fenotipo de la microglía de dos combinaciones de compuestos derivados de *M. parviflora* en un modelo de la EA.** Grupos: WT con vehículo (WT/Veh), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh), WT con combinación 1 (WT/C1), 5XFAD con combinación 1 (5XFAD/C1), WT con combinación 2 (WT/C2), 5XFAD con combinación 2 (5XFAD/C2), WT con meloxicam (WT/Mel), 5XFAD con meloxicam (5XFAD/Mel), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA). Niveles de expresión de **A)** Tyrobp, **B)** Trem2 y **C)** CxCR3 medidos a través de q-PCR. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Bonferroni  $*p \leq 0.05$  vs. WT administrados con el vehículo (Veh).



**Figura 11. Efecto de una combinación de compuestos derivados de *M. parviflora* sobre la morfología de la microglía en un modelo de la EA.** Grupos: WT con vehículo (WT/Veh), 5XFAD con vehículo (5XFAD/veh), WT con combinación 1 (WT/C1), 5XFAD con combinación 1 (5XFAD/C1), WT con meloxicam (WT/Mel), 5XFAD con meloxicam (5XFAD/Mel), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA). Fotografías representativas (línea de escala 70  $\mu\text{m}$ ) de cada grupo con Tinción de Tioflavina-S (verde) más inmunofluorescencia contra Iba1 (rojo) de hipocampo en cortes sagitales de cerebro.

#### **6.3.4- Efecto de la combinación 1 de compuestos presentes en *M. parviflora* sobre la formación de placas de $\beta$ amiloide en un modelo murino de la EA**

Finalmente, para determinar si el efecto positivo observado en las capacidades cognitivas y en la modulación en el estado de la microglía correlacionaban con una disminución en la deposición del péptido  $\beta$  amiloide, se cuantificó la cantidad y el tamaño de las placas de  $\beta$ - amiloide presentes en el hipocampo y la corteza prefrontal de los ratones (Fig. 12), dos zonas indispensables en el proceso de aprendizaje y memoria. Para esto se realizó una tinción con Tioflavina-S en cortes sagitales de cerebro, en los cuales, como se esperaba, se observó que los animales 5XFAD presentan un gran número de placas en corteza prefrontal e hipocampo (Fig. 12 B). Sin embargo, la administración de la C1 o los controles Mel o MpHA, redujo su número de forma significativa (Fig. 12 B), y aunque su tamaño promedio no disminuyó (Fig. 12 C), el área total cubierta por placas, sí lo hizo en ambas zonas (Fig. 12 D).



**Figura 12. Efecto de la combinación 1 de compuestos derivados de *M. parviflora* sobre la deposición del péptido  $\beta$ -amiloide en un modelo de la EA.** Grupos: WT con vehículo (WT/Veh), 5XFAD con vehículo (5XFAD/Veh), WT con combinación 1 (WT/C1), 5XFAD con combinación 1 (5XFAD/C1), WT con meloxicam (WT/Mel), 5XFAD con meloxicam (5XFAD/Mel), WT con extracto hidroalcohólico (WT/MpHA), 5XFAD con extracto hidroalcohólico (5XFAD/MpHA). Tinción con Tioflavina-S en cortes sagitales de cerebro. **A)** Imágenes representativas de tinciones con Tioflavina-

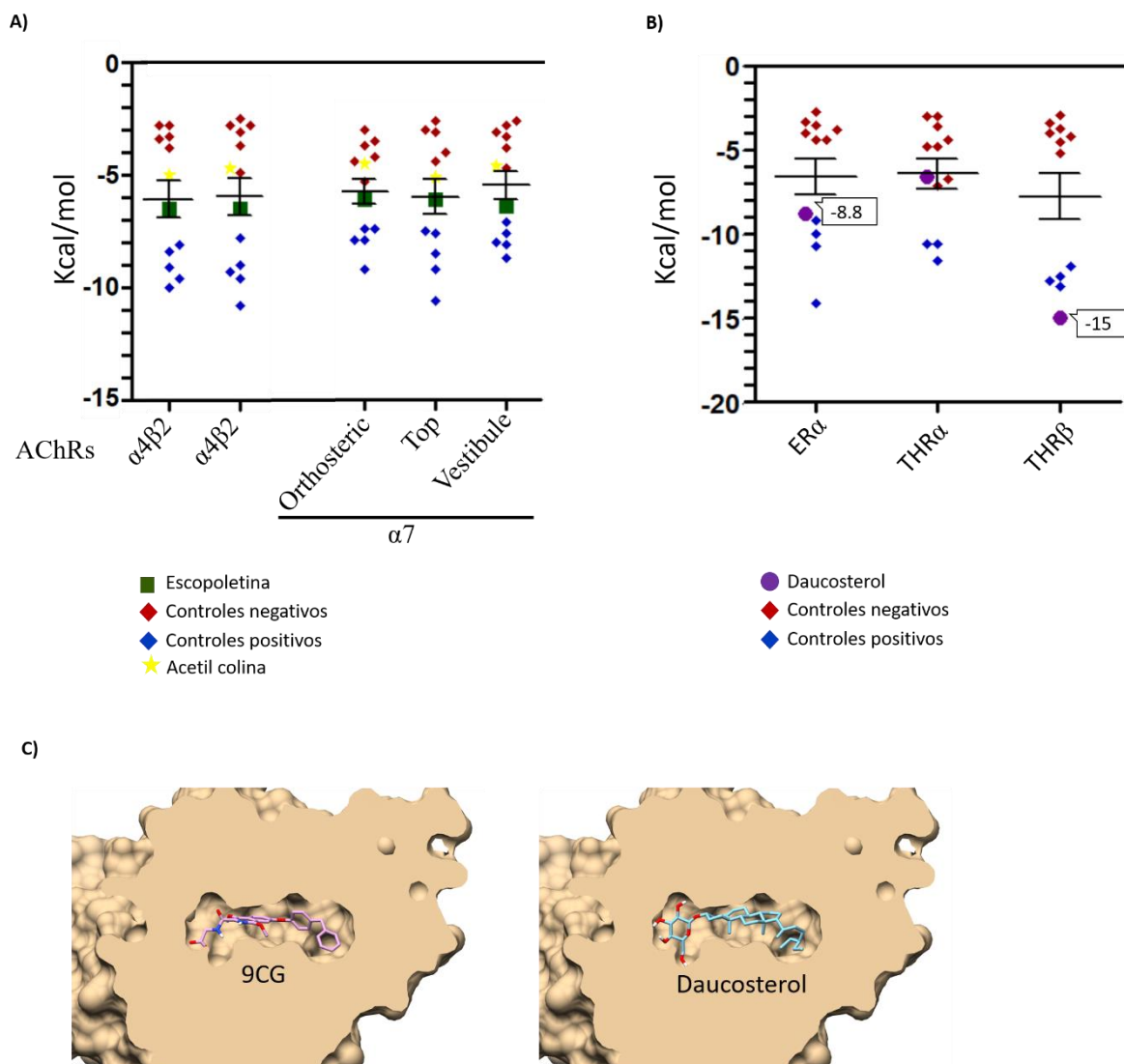
S en subículo y corteza (línea de escala, 200  $\mu\text{m}$ ). **B)** Número y **C)** tamaño promedio de placas. **D)** Área total cubierta por placas calculado usando el software Image J. Análisis estadístico, ANOVA de una vía seguido de una posprueba de Tukey  $*p \leq 0.05$ ;  $**p \leq 0.01$ ;  $***p \leq 0.001$  vs. 5XFAD administrados con el vehículo (Veh).

#### **6.4. Búsqueda de posibles blancos moleculares para escopoletina y daucosterol, mediante acoplamiento molecular**

Nuestros resultados de la evaluación de la C1 y C2 en el modelo 5XFAD nos indican que la C1 constituye una alternativa de posible tratamiento contra la EA. Por ello, y con el objetivo de proponer un posible mecanismo a través del cual los componentes de la C1 ejercen su efecto protector, se realizaron experimentos de acoplamiento molecular.

Previamente, se ha sugerido la posible interacción de Esc y el receptor nicotínico de acetilcolina<sup>58</sup>. Por otro lado, se ha reportado previamente que el MpDau aumenta los niveles de IGF1, y probablemente a través de esto, ejerce su efecto farmacológico<sup>67</sup> y siendo el MpDau un esteroide, podría tener afinidad por los receptores de estrógenos y de la hormona tiroidea, los cuales se ha reportado anteriormente que modulan la expresión de IGF1 y de Trem2<sup>68</sup> donde este último es indispensable para el fenotipo de la microglía DAM-2 y aumentó en los cerebros de animales 5XFAD administrados con la C1.

En el caso de la Esc, se modeló su interacción con los receptores nicotínicos de acetilcolina  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$ , sin presentar alta afinidad en ninguno de los casos comparado con controles positivos como alfa lobelina, cocaína o galantamina<sup>69-71</sup>; sin embargo, su afinidad para los sitios de unión utilizados (-6.5, -6.5, -6.1, -6.1, -6.4 Kcal/mol), fue cercana al del acetilcolina (-5, -4.7, 4.5, -5.1, -4.6 Kcal/mol) su principal ligando fisiológico, por lo que no se descarta un efecto biológico de la Esc sobre estos receptores (Fig. 13 A). Por otro lado, para el caso del MpDau, se modeló su interacción con el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y el receptor de hormona tiroidea alfa y beta (THR $\alpha$  y THR $\beta$ , respectivamente). Descubrimos una afinidad de -8.8 kcal/mol para el ER $\alpha$  y una de -6.6 kcal/mol para el THR $\alpha$ . Sin embargo, la interacción que más vale la pena destacar es la del MpDau con el THR $\beta$ , ya que presentó una afinidad de -15 kcal/mol (Fig. 13 B), mostrando además coincidencia de tamaño y forma entre el ligando y el sitio de unión (Fig. 13 C).



**Figura 13. Modelo de interacción ligando- receptor de daucosterol o escopoletina.** Energía de interacción modelada mediante acoplamiento molecular entre **A)** escopoletina y los receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  (tres diferentes sitios de unión); o **B)** daucosterol y receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) o receptor de hormona tiroidea alfa y beta ( $THR\alpha$  y  $\beta$ ). **C)** Imagen de modelo de la interacción entre daucosterol y  $THR\beta$ .

## 7.- DISCUSION

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que, entre otras cosas, lleva a la pérdida de las capacidades mentales. Esto afecta gravemente la calidad de vida de pacientes y cuidadores, ya que genera gran incapacidad y dependencia<sup>2</sup>. Esta enfermedad es la causa más común de demencia<sup>2</sup>, sin embargo, fue hasta hace pocos años que comenzó a saberse un poco más sobre sus posibles causas y factores de riesgo. A partir de esto, se observó que contrario a lo que antes se pensaba, el proceso inflamatorio que se desarrolla, constituye un factor importante en su inicio y avance<sup>72</sup>. Por lo tanto, condiciones que conllevan un proceso inflamatorio crónico, representan un factor de riesgo importante para este padecimiento<sup>15,73</sup>. Con base en esto, y no existiendo aún algún medicamento que frene su desarrollo, actualmente se buscan alternativas de tratamiento desde una aproximación de modulación del proceso inflamatorio<sup>7,72</sup>. Tal es el caso de este proyecto, cuyo objetivo general fue proponer y evaluar en un modelo de la EA, una mezcla específica de compuestos farmacológicamente activos presentes en *Malva parviflora*.

*Malva parviflora* es una planta herbácea rica en flavonoides y compuestos fenólicos<sup>40,43</sup>; y con una importante actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora ya reportada<sup>20,45,46,49,59</sup>. Su efecto neuroprotector ha sido determinado en diversos modelos murinos de neuro-inflamación y EA. Es importante destacar que en cada reporte se han evaluado distintos extractos y una fracción, los cuales, difieren de la parte de la planta y el solvente utilizado; así como su posterior procesamiento en el caso de la fracción; por lo que cada uno de estos derivados de *M.parviflora*, posee una composición química diferente y debe estudiarse de forma individual.

Considerando lo anterior, en este proyecto se evaluó la MpF10 para determinar su efecto neuroprotector en un contexto de la EA. Para esto, se utilizaron los ratones 5XFAD, los cuales, debido a sus inserciones genéticas, presentan placas amiloides y déficit cognitivo desde edades tempranas. Los animales fueron administrados con la MpF10 o con MpDau, uno de sus componentes principales. De manera interesante, previamente se ha reportado que el MpDau posee actividad anti-inflamatoria a través de reducir la traslocación de NFκB al núcleo, inhibiendo la activación del inflamasoma NLRP3<sup>74</sup>. También para MpDau se ha descrito anteriormente su efecto neuroprotector en un modelo de isquemia/reperfusión en rata, de manera dependiente de IGF1<sup>67</sup>. Alrededor de los ocho meses de edad, después de 24 semanas de administración pudimos observar que la



administración de MpF10 o MpDau revierte el trastorno cognitivo que los animales 5XFAD presentan a esta edad, lo cual mimetiza el efecto observado con el MpHA<sup>20</sup>.

Por otro lado, pudo observarse que los animales 5XFAD desarrollan un comportamiento tipo depresión, lo cual concuerda con lo que se ha reportado que ocurre durante la EA, donde se estima que alrededor del 50% de pacientes presenta síntomas de depresión. Esto se ha asociado con una disminución de las neuronas 5-HT (serotoninérgicas) y dopaminérgicas, así como alteraciones en el sistema glutamatérgico<sup>75,76</sup>. Sin embargo, este comportamiento tiende a disminuir en los ratones 5XFAD al administrar el MpDau y disminuye de manera significativa cuando se utiliza la MpF10 o el MpHA, alcanzando valores similares a los de los animales WT. Esto sugiere que dichos sistemas se reestablecen al menos parcialmente.

Además, los animales 5XFAD mostraron un aumento en su actividad motora, lo cual se revierte con la administración de la MpF10 y presenta una tendencia a disminuir para el caso del MpDau y el MpHA. Sin embargo, pese a que los animales 5XFAD se desplazan más, su conducta exploratoria se encuentra inhibida y no se recupera mediante la administración de los tratamientos. En este sentido, se sabe que, durante la EA, entre otras cosas, se produce la muerte de neuronas glutamatérgicas debido a una sobreexcitación inicial, a lo cual se le conoce como excitotoxicidad. Esta se ha relacionado a alteraciones en el receptor de glutamato NMDA o al déficit de producción de energía que se da principalmente por alteraciones en la señalización de insulina<sup>77,78</sup>. Es de resaltar que el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SN, por lo que alteraciones en su función, en el caso de los humanos, pueden llevar a trastornos psiquiátricos como ansiedad, y en los animales podría impactar en su actividad motora<sup>79,80</sup>. Sin embargo, esta relación no está claramente descrita aún, y probablemente es más compleja que lo que aquí se expone, involucrando diferentes sistemas neuronales, pero podría explicar al menos en parte, lo observado.

Por otro lado, los animales 5XFAD, mostraron niveles elevados de dos citocinas proinflamatorias y una mayor cantidad de placas y de mayor tamaño en comparación con los animales WT; sin embargo, ambos parámetros disminuyeron al administrar la MpF10, el MpDau o el MpHA. En conjunto, estos datos demuestran el efecto antiinflamatorio y neuroprotector de estos tratamientos al disminuir los niveles de citosinas proinflamatorias y promover la memoria y el aprendizaje. Cabe señalar que en el caso del MpDau, ya se ha

reportado anteriormente que aumenta los niveles de IGF1 y activa la vía de señalización de Akt en cultivos de neuronas corticales, protegiéndolas del daño ocasionado por privación/reperfusión de oxígeno y glucosa<sup>67,81</sup>. Además, este compuesto, reduce la traslocación nuclear de NFκB, lo que resulta en la inhibición de la activación del inflammasoma NLRP3 en hígado con daño por alcohol<sup>74</sup>. Importantemente, ambas vías de señalización, se han reportado alteradas en el contexto de la EA. Por ejemplo, niveles bajos de IGF1 se han asociado a un mayor riesgo de padecer la enfermedad<sup>82</sup>; y, por otro lado, la señalización por NFκB y NLRP3 se relacionan al desarrollo de neuroinflamación y EA<sup>83</sup>, por lo que inhibir esta vía, resultaría benéfico en pacientes que la padezcan.

De acuerdo a lo anterior, resulta importante determinar como la administración de MpDau que conduce a un incremento de IGF1, a mayor activación de la vía de Akt y a la reducción en la traslocación de NFκB, tiene un impacto positivo en esta enfermedad. Por otro lado, es de relevancia considerar, el momento de administración del MpDau y, por lo tanto, la temporalidad de los eventos generados durante el desarrollo de la EA. Lo anterior, debido a que, en etapas muy tempranas, un proceso inflamatorio agudo ayudaría a mitigar las marcas de la enfermedad, pero una vez establecido una inflamación crónica, ésto contribuiría a potenciar el daño observado en el padecimiento.

De cualquier manera, en este trabajo demostramos que la administración de MpDau es capaz de disminuir la inflamación y la formación de placas de βA y con esto, mejorar el estado cognitivo en ratones 5XFAD, posiblemente a través de modular los niveles de IGF1 o NFκB y NLRP3. Adicionalmente, basándonos en los resultados obtenidos en el comportamiento tipo depresión en los animales, podríamos pensar que el MpDau protege la integridad neuronal general a través de la modulación del estado inflamatorio. Sin embargo, la MpF10, además de contener MpDau, posee otros compuestos, que podrían ayudar a mejorar este comportamiento, probablemente al actuar directamente sobre el sistema serotoninérgico, dopaminérgico o glutamatérgico; o bien potenciando el efecto del MpDau, aumentando su biodisponibilidad.

Por otro lado, la composición química compleja que representa un extracto o fracción dificulta su completa caracterización. Por lo tanto, en este trabajo se buscó determinar una combinación específica de compuestos provenientes de *M. parviflora*; que mediante una interacción farmacológica aditiva o sinérgica logran recapitular el efecto anti-inflamatorio y neuroprotector ejercido por el MpHA o el MpF10 en el contexto de la EA. Para esto, se

determinaron las interacciones farmacológicas de cinco compuestos biológicamente activos presentes en esta planta en la línea celular RAW-Blue, la cual constituye un modelo de inflamación relativamente sencillo que permite la evaluación simultánea de diversas condiciones.

Para la determinación de las interacciones farmacológicas, se seleccionaron cinco compuestos encontrados anteriormente en *M. parviflora*: (Esc, Tili, AO, AU y MpDau<sup>20,40,59</sup>), los cuales, poseen de manera individual, reportes de su actividad anti-inflamatoria o neuroprotectora en diversos contextos<sup>20,53,88,89,57,67,74,81,84-87</sup>. A los compuestos se les determinó su eficacia y potencia ( $E_{max}$  y  $CE_{50}$ ), de ellos, los más efectivos fueron Tili y Esc. Por otra parte, los de mayor potencia fueron Esc y MpDau, logrando un efecto 50 desde concentraciones de 3 y 5  $\mu\text{g/ml}$  aproximadamente (Esc, 15.82  $\mu\text{M}$ ; Dau, 9.34  $\mu\text{M}$ ); mientras que extractos o fracciones de esta misma planta necesitan concentraciones 10 o hasta 100 veces mayores para lograr el 50% de su  $E_{max}$ <sup>20,59</sup>.

Posteriormente, con base en la  $CE_{50}$  calculada para cada compuesto, se determinaron los rangos de concentración a utilizar para las interacciones farmacológicas, lo cual se hizo mediante un análisis de desplazamiento de la curva y uno de tipo isoblograma. De esta manera, se determinaron diferentes tipos de interacciones entre los compuestos, la sub-aditiva, la aditiva y la sinérgica. La sub-aditiva o antagonista, se identificó ya que el efecto observado es menor al efecto calculado teóricamente; el cual se obtiene, mediante la suma del efecto individual de cada componente. También encontramos interacción aditiva, en la cual, el efecto es igual o muy cercano al calculado, y la sinérgica, donde se observa un efecto mayor al esperado. En este sentido, resulta de gran interés las interacciones aditivas o sinérgicas, ya que pueden lograr un mayor efecto con dosis menores. Esto implica en términos generales, menores efectos adversos. Además, observar un efecto sinérgico en estas condiciones, podría sugerir que las moléculas evaluadas tienen blancos moleculares distintos.

Como resultado de estos experimentos, se determinó que el MpDau y la Esc presentan una interacción de tipo sinérgica, ya que exhiben un mayor efecto que el calculado de forma teórica. De las diferentes concentraciones utilizadas con dichos compuestos, la que presentó un mayor efecto (110.87%) fue la de 1.95  $\mu\text{M}$  de Esc, más 21.66  $\mu\text{M}$  de Dau. Posteriormente, se buscó enriquecer esta mezcla con un tercer compuesto. Con base en lo reportado previamente, donde se identificó al AO como un

modulador del estado de activación de la microglía<sup>20</sup>, se generaron dos combinaciones para su evaluación en el modelo murino de EA. La C1 estuvo compuesta de Esc y de MpDau, mientras que la C2 estuvo conformada por Esc, MpDau y AO. De manera interesante, la C1 mostró un efecto inmunomodulador y neuroprotector en el modelo 5XFAD. Este efecto fue similar al observado con el MpHA<sup>20</sup>. Sumado a esto, con base en nuestros resultados, el efecto neuroprotector de la C1, es a través de disminuir la neuroinflamación mediada por IL-1 $\beta$  y TNF.

Recientemente, se ha descrito un fenotipo de la microglía DAM, la cual, se sabe que transita desde un fenotipo “homeostático” a un fenotipo DAM-1 y posteriormente a uno DAM-2, este último, dependiente de Trem-2, receptor de células mieloides relacionado a fagocitosis. De esta forma, la microglía adopta su fenotipo DAM-2 como un mecanismo protector que busca contener o remover el daño neuronal. Sin embargo, se ha propuesto que, durante el curso de la enfermedad, la microglía se establece en un fenotipo DAM-1 que contribuye al ambiente neuroinflamatorio<sup>66</sup>. Estudios de transcriptoma de célula única, indican que los estadios DAM se caracterizan por marcas genómicas específicas<sup>65</sup>. En el caso del fenotipo DAM-2 se han identificado a Trem2 y Tyrobp (proteína adaptadora de Trem-2) como parte de las marcas transcripcionales de este fenotipo.

De manera interesante, bajo nuestras condiciones experimentales, observamos un aumento en la microglía DAM-2 en los animales tratados con la C1 y el MpHA. Observamos una microglía altamente ramificada, con procesos largos y delgados que se localizan alrededor de las placas de péptido  $\beta$ A. Esto correlaciona con un menor número de placas en la corteza e hipocampo de los animales 5XFAD tratados con C1. Congruente con esto, se ha reportado anteriormente que el MpHA es capaz de modificar el fenotipo de la microglía en el contexto de la EA, disminuyendo un fenotipo pro-inflamatorio, a la vez que favorece uno con mayor capacidad fagocítica. Esto resulta en la disminución en la deposición del péptido  $\beta$ A y una mejor capacidad cognitiva en animales 5XFAD<sup>20</sup>. Con base en lo anterior, concluimos que la C1 representa una combinación de compuestos con interacción sinérgica con propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras, ya que mejora los parámetros cognitivos y disminuye la deposición de placas de péptido  $\beta$ A, probablemente, a través de modular el fenotipo de la microglía hacia un fenotipo DAM-2 con alta capacidad fagocítica.

En este contexto, y con el objetivo de proponer un posible mecanismo a través del cual los componentes de la C1 ejercen su efecto neuroprotector, se realizaron experimentos de acoplamiento molecular con posibles blancos para cada componente de acuerdo con la literatura. A partir de estos análisis, observamos que Esc, que se ha propuesto como agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$ )<sup>58</sup>, no presenta una alta afinidad. Estos receptores son indispensables tanto para procesos cognitivos (aprendizaje y la memoria), como para activar la vía anti-inflamatoria colinérgica. Sin embargo, pese a la baja afinidad entre Esc y los nAChR, no se descarta una posible actividad biológica sobre estos receptores. Esto, ya que la afinidad se determina por la constante de asociación y la de disociación, las cuales influirán en el tiempo que el receptor se mantenga activo. En el caso de los nAChR, este tiempo no debe ser muy prolongado, ya que estos receptores forman canales que a la llegada de la acetilcolina (su principal ligando y neurotransmisor) se abren para ejercer su efecto, permitiendo el paso de iones y la despolarización de la membrana. Dichos cambios deben durar un tiempo determinado, ya que, si el canal se mantiene abierto más tiempo del requerido, podría afectar gravemente a la célula. Es por esto, por lo que probablemente la velocidad de disociación (y por lo tanto su constante) debe ser alta, para que el canal regrese a su estado basal rápidamente; reflejando así, una afinidad más baja. Ejemplo de esto, es la acetilcolina, ligando principal de los nAChR, la cual presenta afinidades cercanas a -5, Kcal/mol en los experimentos de acoplamiento molecular realizados; y probablemente en un caso similar, la Esc, con afinidades cercanas a -6 en el mismo experimento. De cualquier forma, la realización de experimentos *in vitro* e *in vivo* resultan necesarios para comprobar o descartar dicho efecto.

En el caso de MpDau, se modeló su interacción con el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y los receptores nucleares alfa y beta de la hormona tiroidea (THR $\alpha$  y THR $\beta$ , respectivamente), encontrando una fuerte afinidad por los dos últimos, pero principalmente para el THR $\beta$ . Nuestro análisis mostró, además, una coincidencia de tamaño y forma entre el ligando y el sitio de unión, lo que sugiere al MpDau como un posible ligando de THR $\beta$ . Sin embargo, se requieren ensayos *in vitro* o *in vivo* para confirmar esta hipótesis.

Se ha establecido que varios metabolitos secundarios pueden actuar de manera simultánea sobre diferentes blancos<sup>90</sup>. En el caso de los ligandos analizados en este estudio, su potencial efecto biológico sobre los receptores propuestos podría explicar, al menos parcialmente, el mecanismo mediante el cual la C1 ejerce su efecto neuroprotector en los animales 5XFAD. Por un lado, se sugiere que la Esc funcione como agonista de

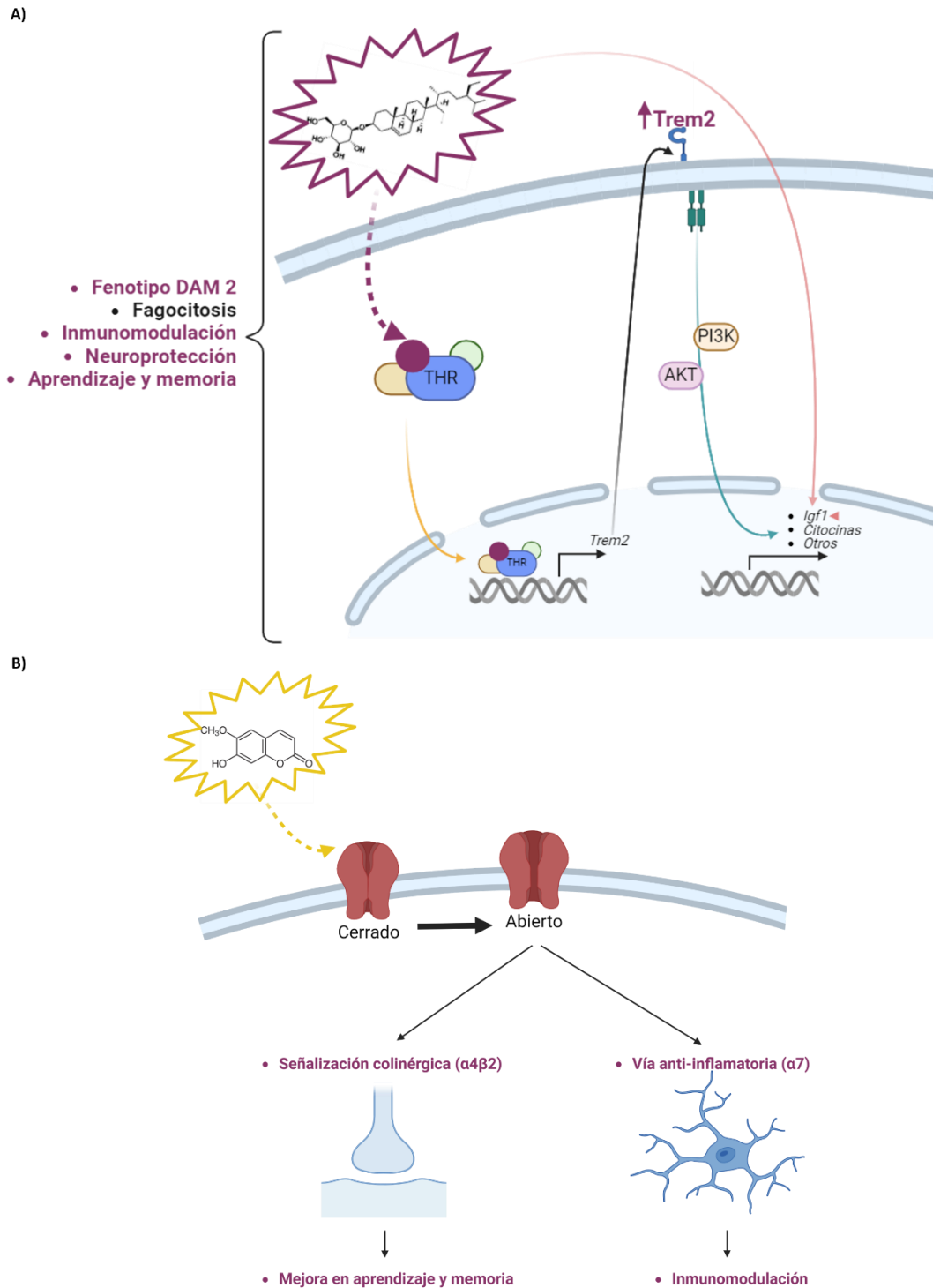
nAChR<sup>58</sup>, promoviendo la señalización colinérgica que es crucial en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria<sup>91</sup>. Además, la Esc podría desempeñar un papel inmunomodulador al promover la vía colinérgica anti-inflamatoria a través del receptor  $\alpha 7$ <sup>92</sup>. Por otro lado, debido a la alta afinidad modelada del MpDau por el THR $\beta$ , se postula que este compuesto podría unirse a dicho receptor e inducir la expresión de sus genes blanco, entre ellos TREM2<sup>68</sup>. De manera similar, bajo nuestras condiciones experimentales, la expresión de TREM2, aumentó al administrar la C1 a los ratones 5XFAD. El aumento en la transcripción de Trem2, probablemente llevó a su vez a incrementar la cantidad de receptor disponible, promoviendo una mayor expresión de los genes que regula a través de sus adaptadores como Tyrobp. Dentro de los genes regulados por Trem-2 y sus adaptadores, se encuentra IGF1 entre varios otros<sup>93</sup>. Interesantemente, se ha reportado que la administración de MpDau es capaz de aumentar los niveles de IGF1<sup>67</sup>, lo cual, podría ser parte de la vía a través de la cual ejerce su efecto neuroprotector e inmunomodulador.

La C1 propuesta en este proyecto podría representar un potencial fármaco o terapia combinada con actividad sinérgica entre sus componentes. Esta combinación podría ofrecer una alternativa con pocos efectos adversos y una gran potencia farmacológica, al abordar diversos aspectos fisiopatológicos implicados en la EA. Dicha aproximación resulta de gran interés para enfermedades complejas y multifactoriales como lo es la EA, ya que esta involucra varias vías de señalización dentro de su fisiopatología. Por lo tanto, una estrategia que contempla diversos blancos y mecanismos de acción, podría ser un abordaje más integral con mejores resultados. Al retrasar el progreso de la EA, este tipo de terapia podría mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes y sus cuidadores. Sin embargo, es importante evaluar el efecto de C1 a través de ensayos preclínicos y clínicos que exploren su farmacocinética y farmacodinamia para garantizar y mejorar la seguridad y eficacia de esta terapia.

Actualmente, son limitadas las propuestas para tratar la EA que buscan una aproximación combinada, apuntando a diversos blancos moleculares a la vez. Algunos ejemplos de ellas son: la combinación de memantina más donezepil; galantamina más memantina; donezepil más cerebrolysin y PBT2 más inhibidores de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, aunque estas combinaciones muestran resultados prometedores en los parámetros evaluados, es necesario profundizar en su estudio<sup>7,94-97</sup>.

Este estudio presenta resultados prometedores sobre los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios de *Malva parviflora*, así como sobre la función cognitiva en ratones 5XFAD. La combinación de los compuestos analizados en esta investigación muestra un efecto sinérgico en su actividad anti-inflamatoria tanto en un modelo *in vitro* como en ratones 5XFAD, mejorando parámetros cognitivos y reduciendo la deposición de placas de péptido  $\beta$ A. Además, los resultados sugieren un cambio en el fenotipo de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio.

Es fundamental destacar que, el desarrollo de terapias para enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, es un campo desafiante y crucial. Los enfoques multifacéticos y los compuestos sinérgicos pueden ofrecer nuevas perspectivas en la búsqueda de tratamientos efectivos. Sin embargo, se requiere una cuidadosa evaluación a través de ensayos preclínicos y clínicos para validar la seguridad y eficacia de estas terapias potenciales.



**Figura 14. Posibles blancos moleculares de C1.** A) Receptor de hormona tiroidea (THR $\alpha/\beta$ ) como posible blanco molecular de daucosterol y B) Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) como posible blanco molecular de escopoletina a través de los cuales ejercen su efecto inmunomodulador y neuroprotector.



## 8.- CONCLUSIONES

La fracción MpF10, exhibe un efecto neuroprotector en el modelo murino 5XFAD. Esta fracción es capaz de revertir el deterioro cognitivo observado en los animales 5XFAD. Además, reduce significativamente el comportamiento tipo depresión desarrollado por estos animales, al mismo tiempo que normaliza su actividad motora. Estos efectos parecen estar, al menos en parte, mediados por la disminución del estado inflamatorio y la cantidad de placas de péptido  $\beta$ A en el cerebro.

El MpDau presenta un efecto neuroprotector e inmunomodulador en un modelo murino de la EA, revirtiendo el deterioro cognitivo en los animales 5XFAD y reduciendo el estado inflamatorio y la cantidad de placas de péptido  $\beta$ A en el cerebro.

El MpDau y la Esc mostraron una interacción sinérgica al disminuir la activación de NF $\kappa$ B y AP1 en la línea celular RAW-Blue, ya que esta interacción mostró un efecto mayor al calculado teóricamente. Esto sugiere la posibilidad de lograr un mayor impacto con dosis menores, lo que, en términos generales, podría resultar en menores efectos adversos.

La C1 compuesta por Esc y MpDau, mostró tener un efecto neuroprotector en el modelo murino de la EA. Este efecto se atribuye, al menos en parte, a su actividad inmunomoduladora, ya que reduce el estado inflamatorio en el cerebro y promueve el fenotipo DAM2 de microglía, caracterizado por su alta capacidad fagocítica. Proponemos que esto conlleva a una disminución en la deposición del péptido  $\beta$ A.

Se proponen los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) como posibles blancos moleculares de la Esc, ya que a pesar de que la afinidad modelada no es muy alta, es cercana a la del principal ligando biológico de estos receptores, la acetilcolina.

Se sugiere que THR $\beta$  es blanco molecular del MpDau. Esto con base en experimentos de modelado por acoplamiento molecular, que muestran una alta afinidad hacia este receptor, junto con una coincidencia de tamaño y forma entre el ligando y el sitio de unión.

## 9.- PERSPECTIVAS

La C1 podría representar una alternativa de tratamiento para la EA con pocos efectos adversos y gran potencia, gracias a su interacción sinérgica y actividad inmunomoduladora y neuroprotectora. Por lo tanto, resulta de gran interés continuar con su evaluación y desarrollo. Se sugiere la realización de ensayos preclínicos y clínicos, incluyendo:

a) Ensayos completos de toxicidad incluyendo pruebas de funcionamiento hepático, renal y genotoxicidad para confirmar su seguridad; así como, ensayos de farmacocinética para determinar la velocidad de absorción, biodisponibilidad, tiempo de vida media, tiempo y vía de aclaramiento.

b) Ensayos clínicos para evaluar la seguridad y actividad farmacológica en humanos.

c) Experimentos *in vitro* para confirmar o descartar los blancos moleculares propuestos, así como investigar otras vías de acción que podrían estar mejorando los parámetros asociados a la EA, como la modificación en la microbiota intestinal.

d) Evaluación farmacológica de los compuestos evaluados encapsulados o con modificaciones moleculares que mejoren su farmacocinética o farmacodinamia y permitan una mayor disponibilidad en el sitio de acción o mayor afinidad hacia sus blancos moleculares.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alzheimer`s disease International; Wimo, Anders; Ali, Gemma-Claire; Guerchet, Maelenn; Prince, Maryin; Prina, Matthew; Wu Y-T. *World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*, <https://www.alzint.org/resource/World-alzheimer-report-2015/> (2015).
2. World Health Organization. Dementia, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (2023, accessed 21 November 2023).
3. Drouin E, Drouin G. The first report of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2017; 16: 687.
4. Chung JA, Cummings JL. NEUROBEHAVIORAL AND NEUROPSYCHIATRIC SYMPTOMS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Neurol Clin* 2000; 18: 829–846.
5. Cárdenas-Aguayo M del C, Gómez-Virgilio L, DeRosa S, et al. The Role of Tau Oligomers in the Onset of Alzheimer's Disease Neuropathology. *ACS Chem Neurosci* 2014; 5: 1178–1191.
6. Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 2009; 47: 289–99.
7. Ramírez-Serrano, Cristina-E; Pedraza-Alva, Gustavo; Pérez-Martínez LM en preparaciòn. *Therapeutic strategies for Alzheimer disease: combined approaches targeting microbiota ecosystem and neuro-inflammaging*. 2023.
8. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, et al. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011; 4: 3.
9. Chen Z-R, Huang J-B, Yang S-L, et al. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* 2022; 27: 1816.

10. DeKosky ST, Ikonomic MD, Styren SD, et al. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2002; 51: 145–155.
11. A. Armstrong R. Review article What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathol* 2013; 3: 169–188.
12. Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. *Neuron* 2010; 68: 270–281.
13. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*; 10. Epub ahead of print March 2014. DOI: 10.1016/j.jalz.2014.02.001.
14. Lim ASP, Kowgier M, Yu L, et al. Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons. *Sleep* 2013; 36: 1027–1032.
15. Dosunmu R, Wu J, Basha MR, et al. Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2007; 7: 887–900.
16. Walker KA, Ficek BN, Westbrook R. Understanding the Role of Systemic Inflammation in Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci* 2019; 10: 3340–3342.
17. Cunningham EL, McGuinness B, Herron B, et al. Dementia. *Ulster Med J* 2015; 84: 79–87.
18. Lim SL, Rodriguez-Ortiz CJ, Kitazawa M. Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease. *Microbes Infect* 2015; 17: 549–556.
19. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, et al. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Front Mol Neurosci*; 9. Epub ahead of print 8 March 2016. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00019.
20. Medrano-Jiménez E, Jiménez-Ferrer Carrillo I, Pedraza-Escalona M, et al.

Malva parviflora extract ameliorates the deleterious effects of a high fat diet on the cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease by restoring microglial function via a PPAR- $\gamma$ -dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 2019; 16: 143.

21. Johansson BB. The Blood-Brain Barrier in Acute and Chronic Hypertension. pp. 211–226.
22. Elahy M, Jackaman C, Mamo JC, et al. Blood–brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. *Immun Ageing* 2015; 12: 2.
23. Alahmari A. Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plast* 2021; 2021: 1–10.
24. Ardura-Fabregat A, Boddeke EWGM, Boza-Serrano A, et al. Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* 2017; 31: 1057–1082.
25. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 2004; 1: 14.
26. Zhang C, Wang Y, Wang D, et al. NSAID Exposure and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis From Cohort Studies. *Front Aging Neurosci*; 10. Epub ahead of print 28 March 2018. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00083.
27. Breitner JC, Baker LD, Montine TJ, et al. Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial. *Alzheimer's Dement* 2011; 7: 402–411.
28. Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology* 2007; 68: 1800–1808.
29. Lazzaroni M, Bianchi Porro G. Gastrointestinal side-effects of traditional non-

- steroidal anti-inflammatory drugs and new formulations. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 48–58.
30. Kearney PM, Baigent C, Godwin J, et al. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 2006; 332: 1302–1308.
  31. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* 2006; 26: 10129–10140.
  32. Schmid S, Jungwirth B, Gehlert V, et al. Intracerebroventricular injection of beta-amyloid in mice is associated with long-term cognitive impairment in the modified hole-board test. *Behav Brain Res* 2017; 324: 15–20.
  33. Thies W, Bleiler L. 2012 Alzheimer's disease facts and figures Alzheimer's Association \*. *Alzheimer's Dement* 2012; 8: 131–168.
  34. Burns R, Nichols LO, Martindale-Adams J, et al. Primary Care Interventions for Dementia Caregivers: 2-Year Outcomes From the REACH Study. *Gerontologist* 2003; 43: 547–555.
  35. Zeng Y, Zhang J, Zhu Y, et al. Tripchlorolide improves cognitive deficits by reducing amyloid  $\beta$  and upregulating synapse-related proteins in a transgenic model of Alzheimer's Disease. *J Neurochem* 2015; 133: 38–52.
  36. Zhu Z, Yan J, Jiang W, et al. Arctigenin Effectively Ameliorates Memory Impairment in Alzheimer's Disease Model Mice Targeting Both  $\beta$ -Amyloid Production and Clearance. *J Neurosci* 2013; 33: 13138–13149.
  37. Argueta-Villamar, Arturo; Cano-Asseleih, Leticia; Rodarte, Maria-Elena; Gallardo-Vázquez MC. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Instituto Nacional Indigenista,

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/index.html> (1994).

38. Taxonomicon T. Taxon: Species *Malva parviflora*, The Taxonomicon; [taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=77258&src=0](http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=77258&src=0) (2000, accessed 4 December 2023).
39. Espinosa- Garcia, Francisco- Javier; Sarukhán JUNA de MI de E. *Manual de malezas del valle de México: claves, descripciones e ilustraciones*. Fondo de Cultura Económica, 1997.
40. Lagunas-Herrera H, Tortoriello J, Herrera-Ruiz M, et al. Acute and Chronic Antihypertensive Effect of Fractions, Tiliroside and Scopoletin from *Malva parviflora*. *Biol Pharm Bull* 2019; 42: 18–25.
41. Farhan H, Malli F, Rammal H, et al. Phytochemical screening and antioxidant activity of Lebanese *Eryngium creticum* L. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: S1217–S1220.
42. GAUTAM SS, SANJAY KUMAR N. SCREENING OF ANTIBACTERIAL AND PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS OF MALVA PARVIFLORA LINN. FRUIT EXTRACTS AGAINST RESPIRATORY TRACT PATHOGENS. *Res Plant Biol* 2018; 17–20.
43. H Farhan, H Rammal, A Hijazi, H Hamad, A Daher, M Reda BB. In Vitro Antioxidant Activity Of Ethanolic And Aqueous Extracts From Crude *Malva Parviflora* L. Grown In Lebanon. *Asian J Pharm Clin Res* 2012; 5: 234–238.
44. Altyar AE, Munir A, Ishtiaq S, et al. *Malva parviflora* Leaves and Fruits Mucilage as Natural Sources of Anti-Inflammatory, Antitussive and Gastro-Protective Agents: A Comparative Study Using Rat Models and Gas Chromatography. *Pharmaceuticals* 2022; 15: 427.
45. Bouriche H, Meziti H, Senator A, et al. Anti-inflammatory, free radical-scavenging, and metal-chelating activities of *Malva parviflora*. *Pharm Biol* 2011; 49: 942–946.

46. Shale TL, Stirk WA, van Staden J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *J Ethnopharmacol* 2005; 96: 325–330.
47. Wang X, Bunkers GJ. Potent Heterologous Antifungal Proteins from Cheeseweed (*Malva parviflora*). *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 669–673.
48. Perez Gutierrez RM. Evaluation of hypoglycemic activity of the leaves of *Malva parviflora* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Funct* 2012; 3: 420.
49. Aslam M, Sial AA. Neuroprotective Effect of Ethanol Extract of Leaves of *Malva parviflora* against Amyloid- $\beta$  - ( $A\beta$  -) Mediated Alzheimer's Disease. *Int Sch Res Not* 2014; 2014: 1–5.
50. Ding Z, Dai Y, Hao H, et al. Anti-Inflammatory Effects of Scopoletin and Underlying Mechanisms. *Pharm Biol* 2008; 46: 854–860.
51. Antika LD, Tasfiyati AN, Hikmat H, et al. Scopoletin: a review of its source, biosynthesis, methods of extraction, and pharmacological activities. *Zeitschrift für Naturforsch C* 2022; 77: 303–316.
52. Moon P-D, Lee B-H, Jeong H-J, et al. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur J Pharmacol* 2007; 555: 218–225.
53. Zhang X, Wang H, Xu Y, et al. Advances on the Anti-Inflammatory Activity of Oleanolic Acid and Derivatives. *Mini-Reviews Med Chem* 2021; 21: 2020–2038.
54. Lee W, Yang E-J, Ku S-K, et al. Anti-inflammatory Effects of Oleanolic Acid on LPS-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. *Inflammation* 2013; 36:



- 94–102.
55. Shi Y, Sun L, Ji X, et al. Neuroprotective effects of oleanolic acid against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Exp Neurol* 2021; 343: 113785.
  56. Castellano JM, Garcia-Rodriguez S, Espinosa JM, et al. Oleanolic Acid Exerts a Neuroprotective Effect Against Microglial Cell Activation by Modulating Cytokine Release and Antioxidant Defense Systems. *Biomolecules* 2019; 9: 683.
  57. Kashyap P, Ram H, Shukla SD, et al. Scopoletin: Anti-amyloidogenic, Anticholinesterase, and Neuroprotective Potential of a Natural Compound Present in *Argyrea speciosa* Roots by In Vitro and In Silico Study. *Neurosci Insights* 2020; 15: 263310552093769.
  58. Hornick A, Lieb A, Vo NP, et al. The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal long-term potentiation and ameliorates anticholinergic- and age-impaired memory. *Neuroscience* 2011; 197: 280–292.
  59. Ramírez-Serrano CE, Jiménez-Ferrer E, Herrera-Ruiz M, et al. A *Malva parviflora*'s fraction prevents the deleterious effects resulting from neuroinflammation. *Biomed Pharmacother* 2019; 118: 109349.
  60. CHOMZYNSKI P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159.
  61. Medrano-Jiménez E, Jiménez-Ferrer Carrillo I, Pedraza-Escalona M, et al. *Malva parviflora* extract ameliorates the deleterious effects of a high fat diet on the cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease by restoring microglial function via a PPAR- $\gamma$ -dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 2019; 16: 143.
  62. Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, et al.

- Dexamethasone Rapidly Regulates TRH mRNA Levels in Hypothalamic Cell Cultures: Interaction with the cAMP Pathway. *Neuroendocrinology* 1998; 68: 345–354.
63. Forner S, Kawauchi S, Balderrama-Gutierrez G, et al. Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Data* 2021; 8: 270.
  64. Manji Z, Rojas A, Wang W, et al. 5xFAD Mice Display Sex-Dependent Inflammatory Gene Induction During the Prodromal Stage of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2019; 70: 1259–1274.
  65. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 2017; 169: 1276-1290.e17.
  66. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, et al. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell* 2018; 173: 1073–1081.
  67. Jiang L, Yuan X, Yang N, et al. Daucosterol protects neurons against oxygen–glucose deprivation/reperfusion-mediated injury by activating IGF1 signaling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 152: 45–52.
  68. Ferrara SJ, Chaudhary P, DeBell MJ, et al. TREM2 is thyroid hormone regulated making the TREM2 pathway druggable with ligands for thyroid hormone receptor. *Cell Chem Biol* 2022; 29: 239-248.e4.
  69. Wu J, Liu Q, Yu K, et al. Roles of nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunits in function of human  $\alpha$ 4-containing nicotinic receptors. *J Physiol* 2006; 576: 103–118.
  70. Ma Z, Jiang N, Huang Y, et al. Cocaine potently blocks neuronal  $\alpha$ 3 $\beta$ 4 nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *Acta Pharmacol Sin* 2020; 41: 163–172.

71. Samochocki M, Höffle A, Fehrenbacher A, et al. Galantamine Is an Allosterically Potentiating Ligand of Neuronal Nicotinic but Not of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 1024–1036.
72. Xie J, Van Hoecke L, Vandenbroucke RE. The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Front Immunol*; 12. Epub ahead of print 6 January 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2021.796867.
73. Matrone C, Djelloul M, Tagliatalata G, et al. Inflammatory risk factors and pathologies promoting Alzheimer's disease progression: is RAGE the key? *Histol Histopathol* 2015; 30: 125–39.
74. Zhang F, Wang M, Zha Y, et al. Daucosterol Alleviates Alcohol-Induced Hepatic Injury and Inflammation through P38/NF- $\kappa$ B/NLRP3 Inflammasome Pathway. *Nutrients* 2023; 15: 223.
75. Yang Z, Zou Y, Wang L. Neurotransmitters in Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 3841.
76. Wang H-Q, Wang Z-Z, Chen N-H. The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: Genetic bases and biological correlates. *Pharmacol Res* 2021; 167: 105542.
77. Ong W-Y, Tanaka K, Dawe GS, et al. Slow Excitotoxicity in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2013; 35: 643–668.
78. Greene JG, Greenamyre JT. Bioenergetics and excitotoxicity. In: *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease*. Elsevier, pp. 125–142.
79. Botto R, Callai N, Cermelli A, et al. Anxiety and depression in Alzheimer's disease: a systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. *Neurol Sci* 2022; 43: 4107–4124.
80. Amani M, Zolghadrnasab M, Salari A-A. NMDA receptor in the hippocampus

alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiol Behav* 2019; 202: 52–61.

81. Jiang L, Yang N, Yuan X, et al. Daucosterol promotes the proliferation of neural stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 140: 90–9.
82. Westwood AJ, Beiser A, DeCarli C, et al. Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy. *Neurology* 2014; 82: 1613–1619.
83. Thawkar BS, Kaur G. Inhibitors of NF- $\kappa$ B and P2X7/NLRP3/Caspase 1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 2019; 326: 62–74.
84. Velagapudi R, El-Bakoush A, Olajide OA. Activation of Nrf2 Pathway Contributes to Neuroprotection by the Dietary Flavonoid Tiliroside. *Mol Neurobiol* 2018; 55: 8103–8123.
85. Corrêa WR, Serain AF, Aranha Netto L, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of the Extract, Tiliroside, and Patuletin 3-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside from *Pfaffia townsendii* (Amaranthaceae). *Evidence-Based Complement Altern Med* 2018; 2018: 1–9.
86. Mogana R, Teng-Jin K, Wiart C. Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). *Evidence-Based Complement Altern Med* 2013; 2013: 1–7.
87. Sapkota A, Choi JW. Oleanolic Acid Provides Neuroprotection against Ischemic Stroke through the Inhibition of Microglial Activation and NLRP3 Inflammasome Activation. *Biomol Ther (Seoul)* 2022; 30: 55–63.
88. Habtemariam S. Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing Brain Injury, Cerebral Ischemia, Cognition Deficit, Anxiety, and Depression. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 1–18.

89. Luan M, Wang H, Wang J, et al. Advances in Anti-inflammatory Activity, Mechanism and Therapeutic Application of Ursolic Acid. *Mini-Reviews Med Chem* 2022; 22: 422–436.
90. Sharifi-Rad M, Lankatillake C, Dias DA, et al. Impact of Natural Compounds on Neurodegenerative Disorders: From Preclinical to Pharmacotherapeutics. *J Clin Med* 2020; 9: 1061.
91. Levin E., Bradley A, Addy N, et al. Hippocampal  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience* 2002; 109: 757–765.
92. Millet T, Roger PL, Eran N, et al. Role of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor and RIC-3 in the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*; 17. Epub ahead of print 12 July 2017. DOI: 10.2174/1871524916666160829114533.
93. Wang Y, Cella M, Mallinson K, et al. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 2015; 160: 1061–71.
94. Shirbhate E, Patel VK, Tiwari P, et al. Combination Therapy for the Treatment of Alzheimer's Disease: Recent Progress and Future Prospects. *Curr Top Med Chem* 2022; 22: 1849–1867.
95. A. Alvarez X, Cacabelos R, Sampedro C, et al. Combination Treatment in Alzheimers Disease: Results of a Randomized, Controlled Trial with Cerebrolysin and Donepezil. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8: 583–591.
96. Lopes JP, Tarozzo G, Reggiani A, et al. Galantamine potentiates the neuroprotective effect of memantine against NMDA-induced excitotoxicity. *Brain Behav* 2013; 3: 67–74.
97. Simoni E, Daniele S, Bottegoni G, et al. Combining Galantamine and Memantine in Multitargeted, New Chemical Entities Potentially Useful in Alzheimer's Disease. *J Med Chem* 2012; 55: 9708–9721.