



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACIÓN DE MARCADORES  
NEUROINFLAMATORIOS POR LA XANTONA V  
AISLADA DEL DURAMEN DE *Calophyllum brasiliense*  
EN ASTROCITOS CORTICALES DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

SERRANO LÓPEZ ELIZABETH MARCELA



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS  
Cd. Universitaria, D. F. 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. DATOS DEL ALUMNO

Serrano  
López  
Elizabeth Marcela  
56 06 38 22 ext. 1096  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306182057

### 2. DATOS DEL TUTOR

Dra.  
Mónica Adriana  
Torres  
Ramos

### 3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.  
Ignacio  
Camacho  
Arroyo

### 4. DATOS DEL SINODAL 2

Dr.  
Ricardo  
Reyes  
Chilpa

### 5. DATOS DEL SINODAL 3

Dr.  
Paul  
Carrillo  
Mora

### 6. DATOS DEL SINODAL 4

Dra.  
Verónica  
Pérez  
De la Cruz

### 7. DATOS DE LA TESIS

Modulación de marcadores neuroinflamatorios por la xantona V aislada del duramen de *Calophyllum brasiliense* en astrocitos corticales de rata.

71 p.  
2014

## **Agradecimientos**

A la Doctora Mónica Torres, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, su tiempo, paciencia y dedicación que tuvo hacia mi formación, tanto académica como personal.

A los miembros del jurado de examen de licenciatura: Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Mónica Torres Ramos, Dra. Verónica Pérez De la Cruz y Dr. Paul Carrillo Mora por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, así como sus valiosas sugerencias y comentarios.

Al personal del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” por su ayuda al proporcionarnos los animales para este proyecto.

Al Dr. Aurelio Campos Ramos por la paciencia, las enseñanzas y la confianza que tuvo en mi al dejar integrarme a su equipo de trabajo, además por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus comentarios tan acertados.

Quiero agradecer a la Dra. Cristina Trejo, a la Dra. Marisol Orozco y a la Dra. Alma Ortiz, por el equipo y material que nos proporcionaron para la realización de este trabajo, así como sus comentarios y su apoyo.

A todos mis amigos del laboratorio por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Yose, gracias por tu amistad durante estos años, por tu tolerancia y apoyo incondicional en las situaciones más difíciles. Isa, gracias por tu amistad, cariño, comprensión, solidaridad y por experimentar en tu cabello. José, gracias por tu apoyo, tus consejos y por tu dedicación a la ciencia. Vic, gracias por tu simpatía, buen humor, y tus clases de entretenimiento y fútbol. Alex, te agradezco tus consejos útiles para mi formación académica y personal.

A la Dra Tatiana Fiordelisis Coll y a los integrantes del Taller de Biofísica, UNAM: Luca, Charly, Ave, José, Diana, Emanuel, Paty, gracias por su apoyo.

A mis amigos y compañeros: Marco, Carlitos, Panchito, Roger, Mezt, Elenita, Andy, Bis, Xoch, Ivan. La pase genial a lado suyo, gracias por todo.

## **Dedicatoria**

A mis padres, Antonia López, Jesús López, Justina López y Manuela López, gracias por el financiamiento de este trabajo, por todo lo que me han enseñado, por su amor, consejos y por su comprensión.

A mis hermanos, Gabi, Gelos, Odet y Migue por su comprensión, motivación, amor y sobre todo, por su paciencia. GRACIAS

A Luis por tu compañía, tu comprensión, tolerancia y motivación en las situaciones más complicadas.

## ÍNDICE

1. ABREVIATURAS .....	6
2. RESUMEN .....	7
3. INTRODUCCIÓN .....	8
3.1. Sistema Nervioso .....	8
3.2. Sistema Nervioso Central (CNS) .....	8
3.2.1. Células del CNS .....	9
3.2.2. Funciones generales de la glía .....	9
3.2.3. Tipos de glía .....	10
3.3. Astrocitos .....	10
3.3.1. Morfología y características .....	10
3.3.2. Funciones de los astrocitos .....	13
3.3.3. Respuesta de los astrocitos al daño .....	14
3.4. Inflamación en el CNS .....	16
3.4.1. Estructura del Lipopolisacárido (LPS) .....	16
3.4.2. Transducción de señales inducidas por LPS .....	17
3.4.3. El LPS como modelo inflamatorio en cultivo de astrocitos .....	19
3.4.3.1. Modelo inflamatorio con LPS en rata .....	20
3.4.3.2. Modelo inflamatorio con LPS en ratón .....	20
3.5. Uso de fitomedicamentos .....	23
3.5.1. Polifenoles .....	23
3.5.2. Xantonas .....	26
3.6. <i>Callophylum brasiliense</i> .....	28
3.6.1. Características de <i>C. brasiliense</i> .....	28
3.6.2. Descripción taxonómica .....	28
3.6.3. Hábitat de <i>C. brasiliense</i> .....	30
4. JUSTIFICACIÓN .....	31
5. HIPÓTESIS .....	33
6. OBJETIVOS .....	33
6.1. OBJETIVO GENERAL .....	33
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	33
7. MÉTODOS .....	34
7.1. Cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatas .....	34
7.1.1. Inmunocitoquímica .....	35
7.2. Obtención de la xantona V .....	36
7.3. Efecto de la xantona V en la viabilidad celular .....	36
7.3.1. Ensayo de MTT .....	36
7.4. Estandarización del modelo inflamatorio .....	37
7.4.1. Inmunocitoquímica .....	38
7.4.2. Western Blot .....	38

7.5. Efecto de la xantona V en el modelo inflamatorio .....	40
7.5.1. Inmunofluorescencias .....	40
7.5.2. Western-Blot .....	42
7.6. Análisis de imagen.....	42
8. RESULTADOS .....	44
8.1. Estandarización del modelo inflamatorio <i>in vitro</i> .....	44
8.1.1. Caracterización de los astrocitos corticales de ratas neonatas .....	44
8.2. ETAPA 1. Modelo inflamatorio en cultivo de astrocitos corticales de ratas neonatas .....	45
8.2.1. La disminución de suero bovino fetal (FBS) induce astrogliosis .....	45
8.2.2. El LPS induce la expresión de p65 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	46
8.3. ETAPA 2. Modulación de marcadores inflamatorios por la xantona V .....	48
8.3.1. La xantona V mantiene la viabilidad celular .....	48
8.3.2. El incremento de la proteína acidica fibrilar glial (GFAP) es inhibido por la xantona V .....	49
8.3.3. El incremento de p65 es inhibido por la xantona V .....	50
8.3.4. La xantona V inhibe el incremento de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) inducido por LPS .....	51
8.3.5. La xantona V inhibe el incremento de TNF- $\alpha$ inducido por LPS .....	52
8.3.6. El incremento de ciclooxigenasa-2 (COX-2) es inhibido por la xantona V .....	53
9. DISCUSIÓN .....	54
9.1. Estandarización del modelo de inflamación .....	54
9.2. La xantona V protege a los astrocitos de la inflamación inducida por LPS .....	55
9.2.1. La astrogliosis inducida por LPS es disminuida por la xantona V .....	55
9.3. Vías de señalización involucradas en el efecto anti-inflamatorio de la xantona V .....	57
9.3.1. La xantona V inhibe la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LPS .....	57
9.3.2. La expresión de TNF- $\alpha$ y COX-2 inducida por LPS es inhibida por la xantona V, además con la participación del EtOH disminuye la de p65 e iNOS .....	58
10. CONCLUSIONES .....	61
11. REFERENCIAS .....	62

## 1. ABREVIATURAS

Por sus siglas en inglés		Por sus siglas en inglés	
<b>AP-1</b>	Proteína activadora -1	<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>APP</b>	Proteína precursora de amiloide	<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato	<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovina	<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2	<b>NGS</b>	Suero normal de cabra
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado de Dubelcco	<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>NSAIDs</b>	Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>ER</b>	Receptor de Estrógeno	<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>ERK1/2</b>	Señal extracelular regulada por cinasas 1/2	<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Hierro	<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>GFAP</b>	Proteína acida glial fibrilar	<b>SOD 2</b>	Superoxido dismutasa
<b>HBSS</b>	Solución salina de Hank equilibrada	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>IFN</b>	Interferón	<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>IL</b>	Interleucina	<b>FBS</b>	Suero Bovino Fetal
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible	<b>CNS</b>	Sistema Nervioso Central
<b>IRAK</b>	Receptor de Interleucina-1 asociado a cinasa	<b>STAT-1</b>	Transductor de señal y activador de transcripción 1
<b>JNK</b>	Cinasas c-Jun terminal N	<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido	<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitogeno	<b>TRAF</b>	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral



## 2. RESUMEN

**Introducción.** La respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central es regulada principalmente por las células gliales, las cuales desempeñan una función importante en la defensa cerebral, sin embargo, se ha relacionado la actividad excesiva de éstas células con diferentes enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La xantona V (1, 3, 5, 6-tetrahidroxi-2-(3, 3-dimetilalil)-xantona), aislada de la madera de *Calophyllum brasiliense*, es un compuesto polifenólico con propiedades antibióticas, antimicóticas y antioxidantes.

**Objetivos.** Estandarizar el modelo inflamatorio con lipopolisacárido (LPS) en astrocitos corticales de ratas neonatas en cultivos primarios. Investigar la capacidad de la xantona V para proteger a los astrocitos de un estímulo inflamatorio inducido por LPS, a través de la inhibición de moléculas implicadas en la vía de NF- $\kappa$ B.

**Métodos.** Los cultivos primarios de astrocitos corticales de rata fueron pre-tratados 1 h con xantona V (1, 2.5, 5  $\mu$ M) disuelta en 0.005 % de etanol (EtOH), y estimuladas con LPS (50  $\mu$ g/ml) durante 48 h, condiciones experimentales previamente estandarizadas del modelo inflamatorio en los astrocitos. La respuesta inflamatoria fue determinada por la expresión de proteínas involucradas en el proceso de inflamación: GFAP, y por la vía de NF- $\kappa$ B: p65, subunidad de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS usando las técnicas de inmunofluorescencias y Western Blot.

**Resultados.** El tratamiento de LPS aumenta la expresión de GFAP, p65, TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS. El pre-tratamiento con la xantona V y del vehículo (EtOH 0.005%), inhibe la expresión y translocación de p65, además disminuye la expresión de GFAP e iNOS, sin embargo, el pre-tratamiento con la xantona V provocó una disminución en la expresión de de COX-2 y TNF- $\alpha$  sin participación del vehículo.

**Conclusiones.** El tratamiento con LPS favorece la expresión de proteínas pro-inflamatorias en los astrocitos de acuerdo a lo reportado en la literatura. Además, con nuestros resultados sugerimos que la xantona V, participa en dos mecanismos moleculares involucrados en la prevención de la inflamación inducida por LPS: uno por la vía de NF- $\kappa$ B en posible sinergia con el EtOH y otra vía involucrada en la disminución de la expresión de TNF- $\alpha$ , COX-2, e iNOS.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 El Sistema Nervioso**

El sistema nervioso es un sistema complejo que coordina e integra múltiples funciones del organismo: sus receptores sensoriales seleccionan información de origen externo e interno, transmite e integra la información que recibe; además, permite la toma de decisiones y canaliza la información hacia órganos o tejidos específicos; almacena información, que puede ser recuperada cuando es requerida; modifica su estructura y funcionamiento frente a cambios y estímulos, lo cual contribuye al aprendizaje; ciertos componentes o circuitos de células nerviosas pueden generar patrones de actividad que contribuyen al comportamiento global del organismo<sup>1</sup>.

En el sistema nervioso de los vertebrados, considerando las características anatómicas se pueden reconocer dos regiones principales: el CNS, que consta del encéfalo y de la médula espinal; y el sistema nervioso periférico, formado por los nervios craneales, espinales y sus ganglios asociados. El sistema nervioso periférico lleva información desde el ambiente interno y externo al CNS<sup>1,2</sup>.

#### **3.2. El Sistema Nervioso Central (CNS)**

En el CNS, el encéfalo y la médula espinal son los centros principales donde ocurre la correlación y la integración de la información. La médula espinal se ubica en el conducto raquídeo y el encéfalo se encuentra alojado en la cavidad craneal, está rodeado y protegido por tres meninges: la duramadre, la aracnoides y la piamadre<sup>1</sup>.

En términos de ontogenia el encéfalo se divide en tres estructuras principales: rombencéfalo, mesencéfalo y prosencefalo<sup>2</sup>. El rombencéfalo, está organizado por: el bulbo raquídeo, la protuberancia y el cerebelo. El mesencéfalo es un segmento corto en forma de cuña, localizado entre el rombencéfalo y el prosencéfalo. La médula espinal está conformado por dos porciones: 1) el diencéfalo, que incluye el tálamo, hipotálamo y el sistema ventricular, y 2) el telencéfalo, constituido por los hemisferios cerebrales y ganglios basales.<sup>1,3-5</sup>

### 3.2.1 Células del CNS

El CNS es una red compleja de diversos tipos celulares que pueden dividirse en dos categorías: 1) las células nerviosas o neuronas, y 2) las células neurogliales o también denominadas gliales o glía<sup>2,6</sup>.

La neurona está constituida por un cuerpo celular o soma, que posee un núcleo, citoplasma o pericarion, del cual emergen un número variable de prolongaciones cortas denominadas dendritas y una prolongación larga llamada axón; las dendritas y los axones se encargan de recibir y transmitir la información mediante comunicaciones especializadas denominadas sinapsis, en donde las membranas de células adyacentes están en íntima aposición<sup>7</sup>. Las neuronas presentan una amplia diversidad de formas y tamaños dependiendo de su ubicación en las diferentes estructuras del CNS<sup>6,7</sup>. Según su distribución las neuronas determinan la existencia de dos formas principales de tejido nervioso: sustancia blanca y sustancia gris. La primera está formada principalmente por los axones, mientras que la segunda, se conforma por la agrupación de cuerpos neuronales, formando núcleos o ganglios o columnas de neuronas<sup>1</sup>.

La glía es el tipo celular más numeroso y variado en el encéfalo, supera en número en una relación de tres a uno a las neuronas. La glía presenta un cuerpo celular en donde se encuentra la mayoría de los organelos, del cual emergen numerosas y variadas proyecciones citoplasmáticas que son menos sobresalientes que las ramificaciones neuronales<sup>7</sup>. Estas proyecciones, junto con las prolongaciones de las neuronas forman una red llamada neurópilo, que se sostiene a sí misma y a las neuronas. Las funciones de sostén que proporciona la glía, ayudan a definir contactos sinápticos, a mantener la capacidad de señalización de las neuronas y en la reparación de lesiones. La glía puede multiplicarse y dividirse en el sistema nervioso maduro<sup>8</sup>.

### 3.2.2 Funciones generales de la glía

El término glía del griego “γλῖα” significa pegamento y refleja la suposición existente en el siglo XIX de que estas células de alguna forma mantienen unido al CNS<sup>9</sup>. Sin embargo, estudios recientes han mostrado diferentes funciones adicionales, como mantener el medio iónico de las células nerviosas, regular la velocidad de propagación de las señales nerviosas,

modular la acción sináptica al controlar la captación de neurotransmisores en la hendidura sináptica o cerca de ella, proporcionar un andamiaje para ciertos aspectos del desarrollo neural y ayudar en la recuperación de la lesión neuronal, o en algunos casos impedirlo<sup>5,9-11</sup>. Ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad e incluso envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas proinflamatorias, proceso denominado como gliosis reactiva o glía activada<sup>12</sup>. Cabe aclarar que no toda la glía responde de la misma manera cuando se produce un daño neuronal<sup>13</sup>.

### **3.2.3 Tipos de la glía**

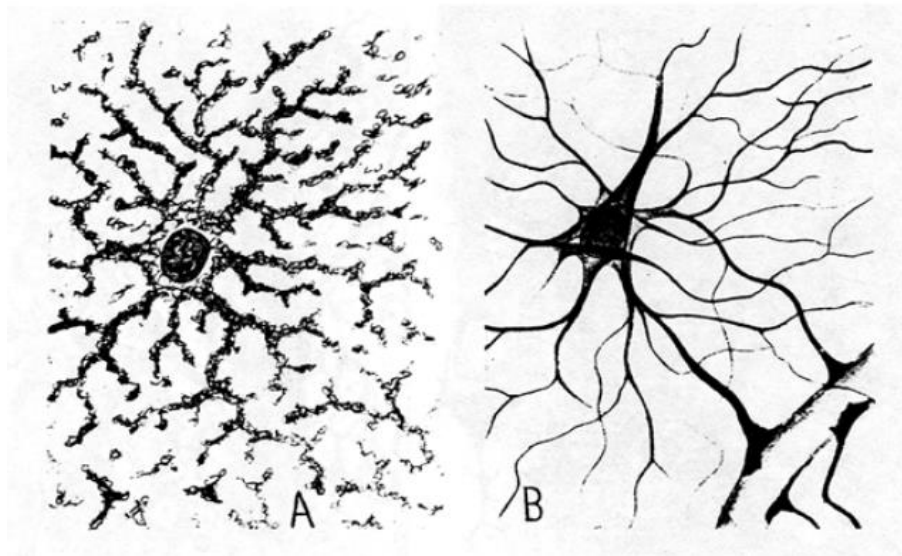
Se reconocen tres tipos de células gliales en el CNS maduro: la microglía, oligodendrocitos y astrocitos<sup>7</sup>. La microglía deriva en mayor medida de células precursoras hematopoyéticas, aunque algunas pueden derivar directamente de células precursoras neurales, ya que comparten muchas propiedades con los macrófagos que se encuentran en otros tejidos, se encargan de la eliminación de restos celulares de sitios de lesión o de recambio celular normal<sup>13</sup>. Los oligodendrocitos y los astrocitos, ambas de origen ectodérmico, son conocidos como las células gliales verdaderas o macroglía. Los oligodendrocitos están restringidos al CNS, depositan una envoltura laminada y rica en lípidos llamada mielina alrededor de los axones neuronales. Los astrocitos, están limitados al encéfalo y la médula espinal, poseen prolongaciones locales elaboradas que brindan a estas células un aspecto estrellado, de ahí el prefijo “astro”<sup>5,7,13</sup>.

## **3.3. Astrocitos**

### **3.3.1 Morfología y características**

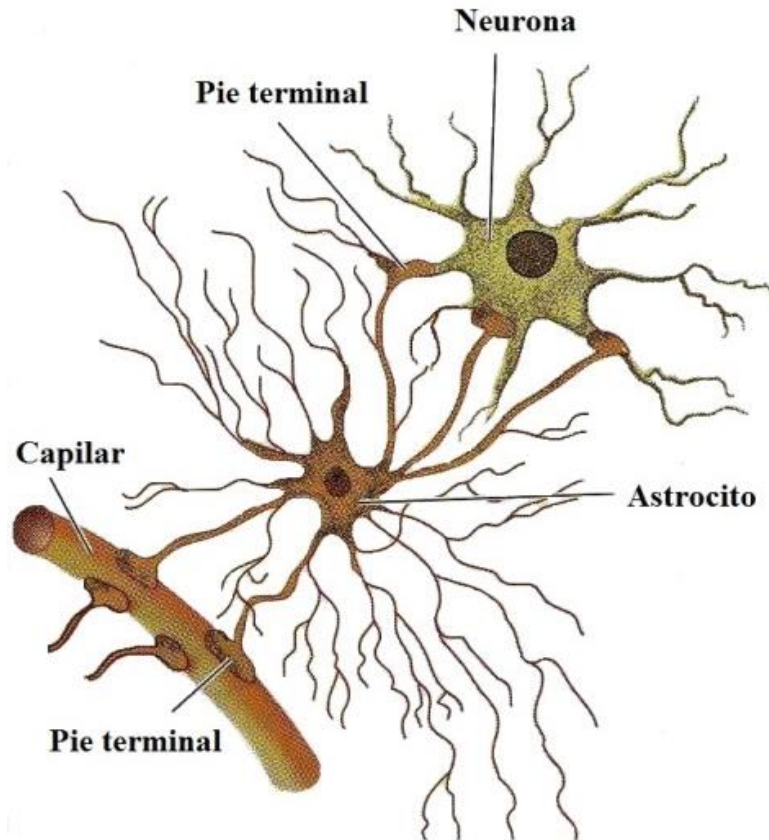
A finales del siglo XIX, Andriezen y Doelliker<sup>14,15</sup> describieron dos clases de astrocitos de acuerdo a sus características morfológicas y distribución dentro del CNS *in vivo*: a) los protoplásmicos, que están distribuidos de manera relativamente uniforme dentro de la materia gris, se caracterizan por su morfología arborescente, con un gran número de prolongaciones con ramificaciones y, b) los fibrosos que se organizan a lo largo de los tractos

de la sustancia blanca, donde están orientados longitudinalmente en el plano de los haces de fibras, tienen formas más estrelladas con prolongaciones largas poco ramificadas (Imagen 1)<sup>10,16-18</sup>. En cultivos primarios de astrocitos se han descrito dos poblaciones: los denominados astrocitos de tipo I, que no presentan prolongaciones y constituyen la subpoblación predominante, y los astrocitos de tipo II, con prolongaciones y presentes en menor proporción<sup>21,22</sup>.



**Imagen 1.** Tipos de astrocitos de humano. A. Astrocito protoplásmico de la materia gris, B. Astrocito fibroso de la materia blanca<sup>13</sup>.

Además se han descrito otros tipos ya sea en el sistema nervioso en desarrollo, glía radial, o en regiones concretas del CNS adulto, como las células de Müller de la retina, glía de Bergmann del cerebelo y tanicitos. Las terminales de las prolongaciones de los astrocitos pueden unirse a un capilar del vaso sanguíneo, e interponerse en la sinapsis neuronal. A esta íntima unión entre neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos se le denomina unión neurovascular<sup>6,19,20</sup> (Imagen 2).



**Imagen 2.** Unión neurovascular. A la íntima unión entre neuronas-astrocitos-vasos sanguíneos se le llama unión neurovascular. Modificado de *Fundamentos Biológicos de la Conducta* <sup>19</sup>.

Sin embargo, ninguna de estas clasificaciones engloba la gran heterogeneidad de astrocitos existentes, puesto que existen evidencias que apuntan que su morfología puede variar en presencia de neuronas y neurotransmisores, durante ciertos estados patológicos y entre diferentes regiones cerebrales<sup>17</sup> es por esto que su estudio mediante marcadores moleculares específicos ha sido de gran importancia. Los marcadores moleculares más frecuentes son: la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), la vimentina y el ligando a calcio S-100 $\beta$ . Sin embargo, se utiliza principalmente la GFAP, ésta tiene un peso molecular de 48 KDa en ratón, 49 KDa en humanos y 51 KDa en rata. La fosforilación y defosforilación de residuos de su región amino terminal regulan su polimerización, en condiciones fisiológicas la mayoría de las GFAP se encuentran formando filamentos intermedios de 10 nm<sup>23</sup>, y está implicada en muchos procesos funcionales de la célula, entre ellos el mantenimiento de la estructura, el movimiento, la comunicación celular y el funcionamiento de la barrera hematoencefálica<sup>23,24</sup>.

Se ha reportado que la vimentina se coexpresa con la GFAP en los astrocitos inmaduros y a medida que maduran, la expresión de GFAP reemplaza a la vimentina<sup>16,18,23,25,26</sup>.

### 3.2.2. Funciones de la astrocitos

La idea clásica que excluía a los astrocitos de una participación activa en la fisiología del CNS se basaba en el hecho de que carecen de la propiedad fundamental que poseen las neuronas: la excitabilidad eléctrica. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas electrofisiológicas, de imagen y del uso de marcadores fluorescentes sensibles a iones, que permiten estimar la concentración y la dinámica intracelular de iones en células vivas, ha permitido demostrar que los astrocitos sí son células excitables y que su excitabilidad se basa en variaciones de la concentración intracelular de calcio<sup>27</sup>. Estas variaciones, pueden presentarse como oscilaciones intrínsecas por actividad espontánea independientes de la actividad neuronal o inducidas por neurotransmisores<sup>6,17,23</sup> y se ha propuesto que son las responsables de la comunicación astrocito-astrocito y astrocito-neurona. En este último caso, las neuronas liberan sustancias como ATP o glutamato, que activan receptores acoplados a proteínas G aumentando la concentración de inositol trifosfato y éste, a su vez, regula la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico<sup>6,23,24,28</sup>, sin embargo, Schummers y cols., en el 2008<sup>29</sup>, encontraron que las oleadas de calcio no se propagan *in vivo* a otros astrocitos, lo cual sugiere que los astrocitos responden como células individuales y con patrones únicos de respuesta, de forma análoga a como lo hacen las neuronas. También, los astrocitos liberan factores de crecimiento y citocinas que ejercen efectos potentes y prolongados sobre la sinapsis. La interrelación entre astrocitos, neuronas forman la sinapsis tripartita, en donde los astrocitos tienen un papel directo e interactivo en la actividad sináptica, por tanto, son indispensables para el correcto procesamiento de la información en los circuitos cerebrales<sup>28</sup>. Por otro lado, gracias a la unión neurovascular, los astrocitos pueden regular el flujo sanguíneo que llega al CNS, acoplando los cambios en la microcirculación cerebral con la actividad neuronal. Los astrocitos captan glucosa de la circulación y proporcionan a las neuronas metabolitos energéticos, contribuyen al correcto metabolismo del CNS<sup>28</sup>, ya que constituyen la principal reserva de gránulos de glucógeno y estos gránulos son más abundantes en zonas de alta densidad sináptica. Además, hay evidencias de que los niveles de glucógeno en astrocitos están modulados por glutamato y que los metabolitos de glucosa

se transmiten a astrocitos vecinos por uniones comunicantes (gap junctions) en un proceso mediado también por glutamato<sup>30</sup>.

La homeostasis de la unión vascular es fundamental para la función cognitiva y su alteración podría estar relacionada con alteraciones cognitivas como la enfermedad de Alzheimer<sup>18</sup>. Recientemente, se ha demostrado que los astrocitos establecen la formación y la reorganización estructural del andamiaje vascular mediante la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular.

Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso. Los axones en crecimiento son guiados hacia sus objetivos mediante moléculas guía derivadas de astrocitos, como tenascina C y proteoglicanos, además participan activamente en la sinaptogénesis, no solo durante el desarrollo sino también tras una lesión del CNS. Se ha sugerido que la actividad neuronal puede a su vez controlar la capacidad sinaptogénica de los astrocitos<sup>28</sup>.

### **3.2.3. Respuesta de los astrocitos al daño**

Los astrocitos son de las primeras células en responder a un daño en el CNS<sup>31</sup> proceso denominado astrogliosis o astrocitos reactivos. La reactividad de los astrocitos es un término que abarca cambios en la morfología y la función en respuesta a una situación crónica deletérea como es el envejecimiento<sup>28</sup>, a una lesión aguda o mecánica del tejido, o a cualquier condición patológica como en alteraciones neurológicas por ejemplo la enfermedad de Alexander o en diferentes enfermedades neurodegenerativas.

El estado reactivo de los astrocitos se definió inicialmente con base en criterios morfológicos, donde el soma y los filamentos intermedios son hipertróficos, además con un aumento en la expresión de GFAP, vimentina y nestina. Existen diversos marcadores para identificar a los astrocitos reactivos incluyendo el aumento en los niveles de ciertas citocinas, moléculas de adhesión y de reconocimiento, así como otras proteínas generalmente asociados a efectos perjudiciales como el ligando a calcio (proteína S100 $\beta$ ), iNOS y COX-2. En lesiones agudas los astrocitos expresan genes tempranos inmediatos, como c-fos, sobreexpresan filamentos intermedios y desencadenan cambios morfológicos en pocas horas<sup>28</sup>.

Los astrocitos reactivos, con el objetivo de proteger a las células del CNS, responden con diferentes eventos fisiológicos y moleculares como lo es el transporte de glutamato desde el



espacio sináptico evitando así la sobrestimulación de receptores glutamatérgicos, también, liberan glutatión para contrarrestar el estrés oxidativo, y facilitan la reparación de la barrera hematoencefálica. Además, limitan la difusión de células inflamatorias y agentes infecciosos, participan en la respuesta inmunitaria y como son más numerosos que la microglía, es posible que sea el componente mayoritario del sistema inmune innato del CNS<sup>28</sup>.

En resumen, la respuesta astrocitaria sirve como sensor del daño a nivel microambiental en cualquier lugar del CNS. Existe evidencia de que las alteraciones de la función astrocitaria pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la adrenoleucodistrofia, enfermedades de Huntington, Parkinson, Alzheimer, entre otras<sup>23</sup>. La reactividad astrocitaria es un marcador de eventos que inducen una respuesta de protección y recuperación del CNS sin embargo, el exceso de la astrogliosis induce efectos perjudiciales (Tabla 1).

**Tabla 1.** Respuestas fisiológicas y moleculares de la astrogliosis que confieren protección o daño.

<b>Respuesta</b>	<b>Efecto benéfico</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Efectos perjudiciales</b>
<b>Liberación de factores neurotróficos</b>	Factor neurotrófico dependiente de actividad	<b>Restricción de la regeneración axonal</b>	Cicatriz glial
<b>Mantenimiento del medio extracelular</b>	Captación de neurotransmisores excitotóxicos, antioxidante	<b>Secreción de sustancias neurotóxicas</b>	Liberación de glutamato
<b>Liberación de moléculas anti-inflamatorias</b>	IL-2, IL-6, Interferón	<b>Liberación de moléculas pro-inflamatorias</b>	Incrementan expresión de citocinas y quimiocinas.
<b>Restauración de la barrera hematoencefálica</b>	Secreción de proteoglicano heparán sulfato, laminina y fibronectina.		
<b>Aislamiento del sitio de lesión y la contención de la infección</b>	Responden a patrones moleculares asociados a patógenos como LPS		

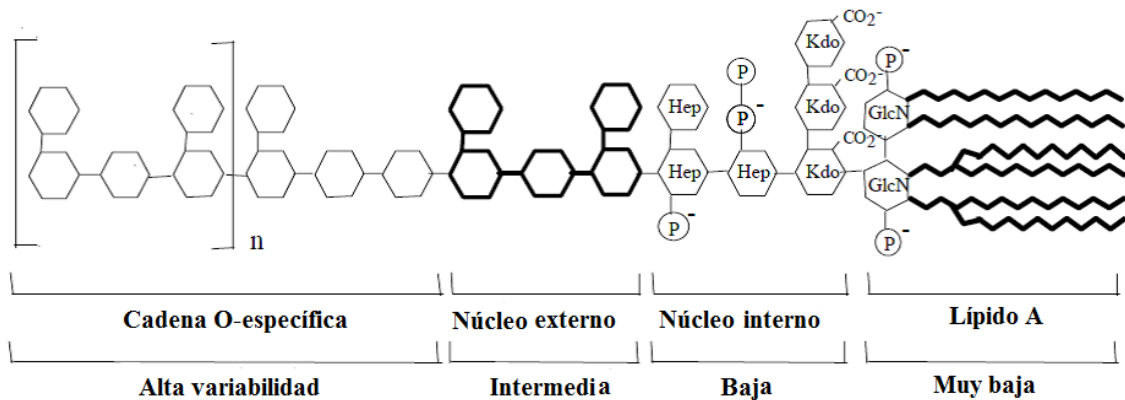
### 3.4 Inflamación en el CNS

La neuroinflamación es definida como la activación del sistema inmune innato del cerebro en respuesta a un reto inflamatorio y se caracteriza por una serie de cambios celulares y moleculares en el cerebro. Las células gliales, principalmente los astrocitos y la microglía, se activan y se vuelven hipertróficas, además expresan de manera excesiva proteínas inmunomoduladoras de superficie celular e incrementan, tanto la síntesis como la liberación de moléculas pro-inflamatorias incluyendo las citocinas, quimiocinas y prostanoïdes<sup>32</sup>. La inducción de estas moléculas está dada por diferentes estímulos inflamatorios, como la exposición a toxinas bacterianas, por ejemplo: el lipopolisacárido (LPS).

#### 3.4.1 Estructura del Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es una endotoxina que representa el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y posee un papel clave en el desarrollo de infecciones y sepsis. Aunque existe una gran variación en la composición del LPS de diversas cepas bacterianas, todos ellos muestran una estructura común. Se trata de moléculas anfipáticas consistentes en una parte polisacárida e hidrofílica que va unida covalentemente a un componente lípido e hidrófobo, denominado lípido A<sup>33</sup>.

El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena O-específica también llamada antígeno O, formada por tres unidades repetitivas de oligosacárido; y el núcleo central. Este a su vez se subdivide en *núcleo externo*, formado por hexosas, mediante el cual se une al antígeno O; y el *núcleo interno*, formado por heptosas. El lípido A se compone en general de un disacárido fosforilado, unido a dos D-glusaminas en posición b1, 6 y que porta un máximo de seis o siete residuos acilo. Este se encuentra unido al *núcleo interno* mediante un residuo llamado ácido 3-deoxi-D-mano-octo-2-ulosónico (KDO) Existen variaciones en la longitud, posición y número de ácidos grasos que componen el lípido A (Imagen 3). Este constituye el principio endotóxico del LPS, mientras que los efectos biológicos son reproducidos por la parte lipídica A libre<sup>33,34</sup>.



**Imagen 3.** Estructura común del LPS de las bacterias. *Modificado de Bermejo, 2003. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido*<sup>34</sup>.

### 3.4.2 Transducción de señales inducidas por LPS.

Cuando el LPS llega al torrente sanguíneo formando parte de las bacterias o en forma libre, procedente de la lisis de microorganismos, por antibióticos por ejemplo, interacciona con algunas de las moléculas que se encuentran en el tejido. Entre estas moléculas están las proteínas bactericidas que incrementan la permeabilidad de la membrana, las proteínas catiónicas denominadas CAP 18, CAP 37 y P15A/P15B, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y proteínas como la albumina y la hemoglobina, entre otras, para dar lugar a una reacción con el hospedero y adoptar la llamada conformación endotóxica. Se ha demostrado que el LPS puede unirse directamente a la célula y mediante el complejo LPS-CD14, a las selectinas P y L solubles o ancladas en la membrana de plaquetas y células endoteliales. Sin embargo, el LPS puede interactuar con los receptores de tipo Toll (TLR), cuando está en grandes concentraciones, en específico al TLR4<sup>33-35</sup>.

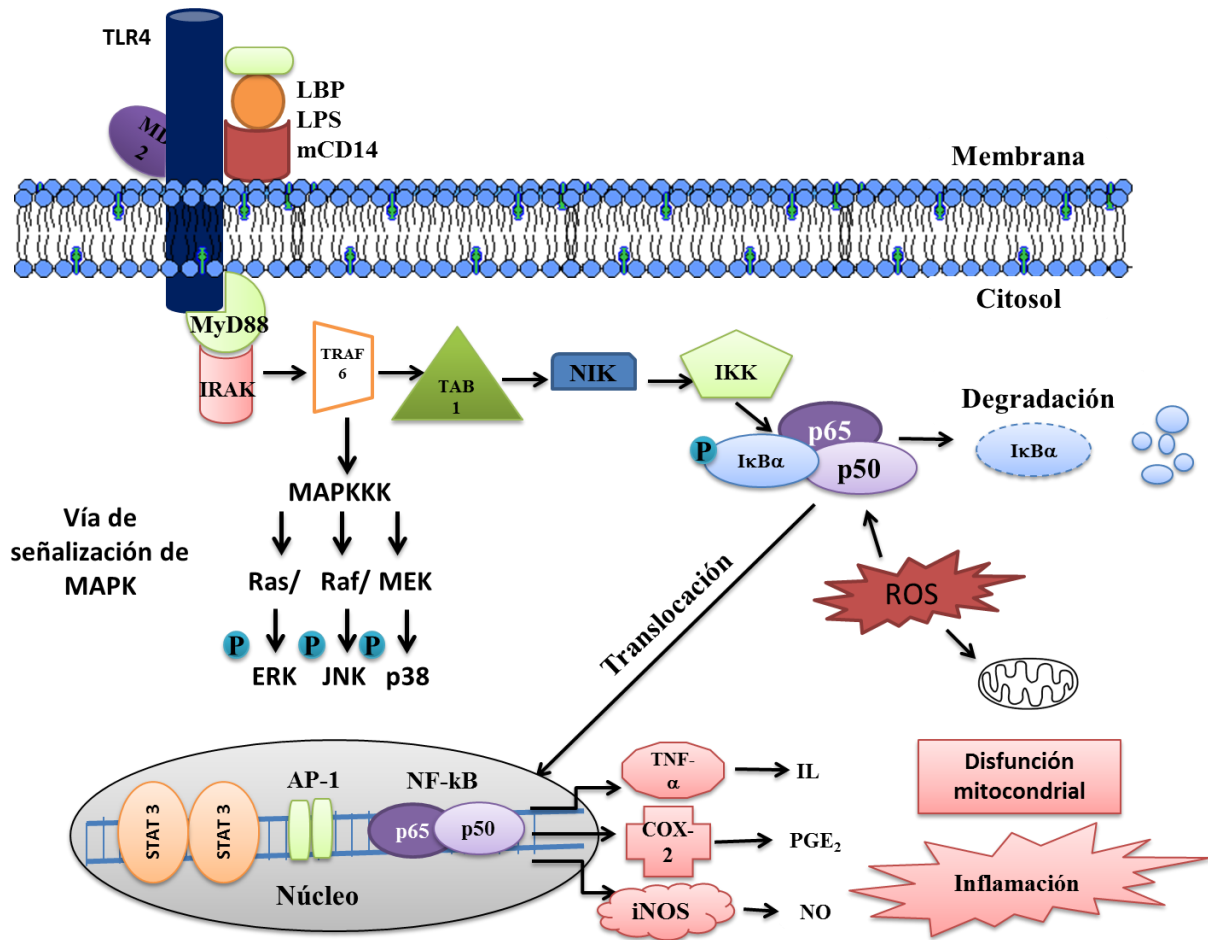
Existen varias proteínas implicadas en la transducción de señales derivadas de la unión de LPS al receptor TLR4. Una de ellas es la proteína mielóide de diferenciación MD-2, proteína de membrana expresada en macrófagos y otras células que tiene la capacidad de unirse al TLR4. En el citoplasma, se requiere la unión al TLR de la proteína mielóide de diferenciación, MyD88, ésta facilita la unión del receptor a su sustrato, la cinasa asociada al receptor de Interleucina 1, IL-1R (IRAK). La IRAK se une a otra proteína adaptadora, el factor asociado al receptor de necrosis tumoral (TRAK-6), la cual se une a la cinasa activada

por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TAK-1) para facilitar la fosforilación de ésta última por IRAK. La cinasa intermediaria TAK-1 puede activar la vía de las JNK, aunque no se ha determinado a que nivel actúa. La proteína asociada a TAK-1 o TAB-1 podría estar implicada junto con ésta, en la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos MAPK tipo JNK y/o p38<sup>34-36</sup>.

El LPS activa una red de proteínas citoplásmicas que pueden dar a la formación de distintos mensajeros secundarios intracelulares. Uno de ellos es el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), cuya activación puede ser realizada por distintas vías. Este factor de transcripción está formado por varias subunidades: p50/105, p65, p52/100, c-Rel y RelB, que se dimerizan para dar a lugar a distintas isoformas inducibles por múltiples factores. Los diferentes modos en que este factor puede ser activado son: a) mediante la vía de las MAPK, y b) por la señalización de los receptores TLR.

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción implicado en la respuesta de diferentes estímulos, entre ellos la IL-1, TNF- $\alpha$  y el LPS. Su importancia radica en que casi todos los genes de los mediadores principales que se inducen son regulados por dicho factor, entre ellos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, COX-2 e iNOS, donde además se han descrito dos sitios de unión al NF- $\kappa$ B en el gen que la codifica, como se observa en la Imagen 4<sup>34,36</sup>.

El conjunto de mecanismos activados por la interacción del LPS con las células y numerosas moléculas plasmáticas hace que se dispare la producción y activación de diversos mediadores implicados en los procesos de la inflamación, de las cuales podemos destacar las citocinas TNF- $\alpha$  y las interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. Además el LPS tiene la capacidad de inducir la producción de radicales libres, ROS y NO<sup>34,36</sup>.



**Imagen 4.** Vía de transducción de señales inducidas por LPS. Representación de las diferentes cascadas de señalización celular provocadas por el estímulo de LPS. El factor de transcripción NF-κB es activado y regula genes de moléculas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS.

### 3.4.3 El LPS como modelo inflamatorio en cultivo de astrocitos.

Existen diversos modelos que permiten mimetizar las características neuroquímicas histológicas y fisiológicas, que acompañan a los procesos inflamatorios cerebrales. Los astrocitos responden a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos como el LPS, incrementando la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. También se ha demostrado que expresan TLRs: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9; además, de los receptores de reconocimiento de PAM (PRRs) como NOD1, NOD2 y el receptor de manosa. Los mediadores inflamatorios liberados por los astrocitos después de la activación de los

PRRs activan células vecinas, amplifican la respuesta inmune inicial y modifican la permeabilidad de la barrera hematoencefálica para permitir la infiltración de los leucocitos que dirigen la respuesta adaptativa. Estos mediadores participan en la inflamación y la inmunosupresión, el equilibrio entre estas dos respuestas es esencial, ya que la desregulación de estas vías puede desencadenar un proceso crónico de neuroinflamación y neurodegeneración. Los astrocitos son una fuente sustancial de citocinas y quimiocinas inmunológicamente relevantes y por lo tanto es un tipo celular importante en la modulación de la respuesta inflamatoria<sup>36-38</sup>. Sin embargo, los modelos inflamatorios con LPS en cultivos primarios de astrocitos de rata y ratón reportados en la literatura científica son relativamente pocos, y las condiciones de los tratamientos son variadas.

#### **3.4.3.1 Modelo inflamatorio con LPS en rata.**

El grupo de Sawada y cols., 1992, fue el primero en realizar estudios de cultivos de astrocitos corticales de rata mantenidos con DMEM acondicionado con 10 % de SBF y estimulados con 0.1 µg/ml de LPS de 3-5 horas, reportaron que este estímulo induce la producción de IL-6, y su mRNA, e induce la síntesis del TNF-α así como de la IL-1<sup>39</sup>. Así mismo, Wilms y cols., 2010, reportaron que en astrocitos incubados con 0.01µg/ml de LPS de *Salmonella typhimurium* durante seis horas aumentan los niveles del mRNA de iNOS, IL-1β, IL-6 y TNF-α<sup>40</sup>. Por otro lado, Sheng y cols., 2011, acondicionaron a los astrocitos con DMEM libre de FBS cuatro horas antes del estímulo con 0.1 µg/ml de LPS de *Escherichia coli* F583 incubados por 24 h; en estos experimentos observaron que el LPS no induce la producción de óxido nítrico, pero éste sí era inducido por el conjunto de las citocinas TNF-α + IL-1β + IFNγ; además, el co-estímulo LPS + IFNγ, indujo un ligero cambio morfológico en los astrocitos<sup>41</sup>.

#### **3.4.3.2 Modelo inflamatorio con LPS en ratón.**

Los modelos neuroinflamatorios realizados en cortezas de ratón son más abundantes, por ejemplo, Johan y cols., 2008<sup>38</sup>, realizaron cultivos primarios de astrocitos corticales de ratón de la cepa Balb/c con DMEM acondicionado con 20 % de FBS hasta obtener el 95 % de

confluencia celular, 48 horas antes de los tratamientos, se reemplazó por DMEM libre de suero con medio neurobasal y fueron expuestas a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS de *Escherichia coli* durante 12 h, lo que indujo una sobrerregulación de enzimas responsables de la síntesis de la prostanglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), una baja regulación de las enzimas que catalizan la degradación de PGE<sub>2</sub> y la producción de leucotrienos pro-inflamatorios; estos cambios fueron acompañados por un aumento significativo en la PGE<sub>2</sub> extracelular, concluyendo así que los astrocitos están involucrados en la regulación de prostanoides pro-inflamatorios en el CNS. Otro ejemplo es el de Liu y cols., 2009, quienes usaron cultivos de astrocitos corticales de ratones de 3 a 4 días de nacidos incubados con DMEM/ F12 suplementado con 10 % de FBS; una vez confluentes disminuyeron el FBS a 1 % dos días antes de los tratamientos de LPS a la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ ; bajo estas condiciones, observaron que este tratamiento reduce significativamente la viabilidad de astrocitos y aumenta la expresión del mRNA de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y del receptor de estrógenos<sup>42</sup>.

En el estudio de Lu y cols., 2010, utilizaron 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, sin especificar la cepa bacteriana, en cultivos primarios de astrocitos corticales de ratones C57BL/6 con DMEM suplementado con 10 % de FBS, incubando durante 8 h con el agente tóxico; bajo las condiciones de este modelo inflamatorio *in vitro*, reportaron que el LPS no reactiva morfológicamente a los astrocitos pero sí estimula la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, y iNOS e induce significativamente la activación de NF- $\kappa$ B<sup>43</sup>.

Lee y cols., 2012, realizaron cultivos primarios de astrocitos corticales de ratón BV-2 de dos días de nacidos, acondicionados con DMEM más 5 % de FBS y después de nueve días reemplazaron DMEM con 10 % de FBS, el cultivo fue tratado con 1 $\mu\text{g/ml}$  de LPS por 24 horas, bajo estas condiciones encontraron altas concentraciones de nitrato en el medio, y un aumento de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, acompañado con la liberación de ROS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Así mismo, Bi y cols., 2013, trabajaron con cultivos de astrocitos corticales de rata de 1 día de nacidos usando DMEM + 10 % de FBS y tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$  de LPS+ IFN (100U/ml) durante 24 h, y sus hallazgos muestran que esta mezcla induce cambios morfológicos importantes, ya que aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B y la producción de iNOS, NO, ROS, y COX-2<sup>45</sup>.

En resumen, la administración de LPS en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata o ratón, induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ; estos

antecedentes nos indican que la inflamación inducida por LPS está relacionada con la activación de NF- $\kappa$ B, factor que regula las condiciones neuropatológicas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación de las diferentes condiciones experimentales y resultados obtenidos en los modelos neuroinflamatorios *in vitro* de LPS, en cultivos de astrocitos corticales de rata y ratón.

Cepa bacteriana del LPS usado	[LPS] $\mu$ g/ml	Modelo animal	FBS (%)	Tiempo (h)	Modulación de marcadores neuroinflamatorios	Referencia
No especificado	0.1	Rata, Corteza	10	3-5	Aumento de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1	(Sawada y cols., 1992)
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.01	Rata, Corteza	10	6	Incremento de iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$	(Wilms y cols., 2010)
<i>Escherichia coli</i> F583	0.1	Rata, Corteza;	No especificado	24	No induce NO	(Sheng y cols., 2011)
<i>Escherichia coli</i>	0.1	Ratón Balb/c, Corteza	No especificado	12	Aumento de PGE <sub>2</sub> extracelular	(Johann y cols., 2008)
No especificado	1	Ratón, Corteza	1	96	Incremento de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$	(Liu y cols., 2009)
No especificado	0.5	Ratón C57BL/6, Cerebro,	No especificado	8	Incremento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e iNOS, NF- $\kappa$ B	(Lu y cols., 2010)
No especificado	1	Ratón BV-2, Corteza	10	24	Aumento de nitrato, PGE <sub>2</sub> , ERO's, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	(Lee y cols., 2012)
<i>Escherichia coli</i> , <u>055:B5</u>	1	Ratón, Corteza	10	24	Aumento de iNOS, NO, EROS, COX2, TLR4 y NF- $\kappa$ B	(Bi y cols., 2013)



### 3.5. Uso de fitomedicamentos

La modulación de cascadas de señalización y los factores de transcripción pro-inflamatorios, así como las citocinas y la producción de NO, en astrocitos, por el uso de agentes terapéuticos como los fitomedicamentos, puede resultar en una supresión de la inflamación, y finalmente, a la protección contra la neurodegeneración<sup>46,47</sup>.

Los fitomedicamentos, son medicamentos elaborados de moléculas químicas, como los polifenoles, aisladas de las estructuras vegetales que poseen acciones terapéuticas, preventivas, curativas o atenuantes de una enfermedad, de manera eficaz y segura. En los últimos años, ha aumentado el interés de estudiar el potencial neuroprotector de los polifenoles, estos componentes que encontramos en nuestra dieta cotidiana pueden representar una nueva estrategia para luchar contra la neurodegeneración, a través de su capacidad para inhibir el estrés oxidativo y la inflamación que llevan a la célula a muerte por apoptosis<sup>46-49</sup>.

#### 3.5.1 Polifenoles

Los polifenoles están presentes en altas concentraciones en una amplia variedad de frutas, verduras y bebidas como el vino tinto y el té<sup>46</sup>. Desde el punto de vista estructural, los compuestos polifenólicos se caracterizan por tener más de un grupo fenol, y se dividen a su vez en subgrupos como los estilbenos, antraquinonas, lignanos, flavonoides y xantonas<sup>50,51</sup>. Estudios recientes en modelos *in vivo* e *in vitro* indican, que los polifenoles presentan efectos como antioxidantes y anti-inflamatorios, aunque los mecanismos moleculares asociados con los efectos anti-inflamatorios aún no están totalmente establecidos, varios estudios *in vitro* indican que actúan principalmente inactivando la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B, y disminuyendo la expresión de marcadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ <sup>52</sup>.

Por ejemplo, el té verde y el cacao son buenas fuentes de flavonoides como la catequina y la epicatequina, estudios recientes revelan que estas moléculas atenúan la producción de Óxido Nítrico en células de glioma de rata de la línea C6 mediante la inactivación de NOS<sup>53</sup>. Los frutos cítricos son excelentes fuentes de la naringenina, hesperetina y las bayas contienen altas concentraciones de antocianinas como la cianidina y malvada. Esto último se ha

observado para ser eficaz en la protección del deterioro cognoscitivo y motor debido al envejecimiento en un modelo *in vivo*<sup>54</sup>.

Se han utilizado distintos modelos con LPS en cultivos primarios de astrocitos para determinar el efecto anti-inflamatorio de diversos polifenoles. Liu y cols., 2009, trataron con diferentes concentraciones de daidzeína, un polifenol tipo isoflavona encontrada principalmente en la soya, y determinaron que a  $10^{-6}$   $\mu$ M con 1 h de pre-tratamiento y a 96 h de co-incubación con LPS disminuye la síntesis de NO, desde el segundo día de tratamiento, y de la expresión génica de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  al igual que el mRNA de ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  inducidas por LPS<sup>42</sup>.

En el trabajo de Lu y cols., 2010, se evaluó el efecto del resveratrol, un componente polifenólico que se halla en las uvas, moras y nueces, determinaron que la concentración de 50  $\mu$ M en astrocitos estimulados con LPS, inhibe la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e iNOS/ NO pero no de IL-1 $\beta$ ; disminuye la fosforilación de JNK, e impide la activación de NF $\kappa$ B, sin embargo, no tiene efecto en la fosforilación de ERK1/2 y p38<sup>43</sup>. En el mismo año Wilms y cols., utilizaron el dimetil-fumarato, éster comúnmente utilizado en infecciones cutáneas, y reportaron que la concentración de 10  $\mu$ M inhibe la expresión del mRNA de iNOS, IL-6 y TNF- $\alpha$  en astrocitos tratados con LPS<sup>40</sup>. En el trabajo de Lee y cols., 2012, hallaron que la 4-O-metil onikiol a 2  $\mu$ M suprime la expresión de iNOS y COX-2, inhibe la producción de ROS, NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , además, la 4-O-metil onikiol evita la degradación de I $\kappa$ B, sugiriendo que este es el posible mecanismo por el cual el NF- $\kappa$ B no actúa como un factor de transcripción de proteínas pro-inflamatorias<sup>44</sup>.

El catalpol, un glucosido iridioide aislado de las raíces de *Rehmannia glutinosa*, fue estudiado por Bi y cols., 2013, sus resultados muestran que a 500  $\mu$ M reduce la producción de NO y ROS, así como la actividad de iNOS y atenúa la expresión de genes participantes en la inflamación: iNOS, COX-2 y TLR4, sugiriendo que el catalpol puede ejercer efectos inhibitorios en la reacción inflamatoria de los astrocitos<sup>45</sup>, las condiciones que utilizaron los diferentes trabajos reportados se presenta resumida en la tabla 3.

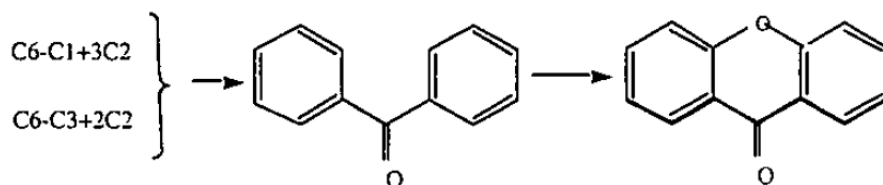
**Tabla 3.** Comparación de estudios realizados en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata y ratón tratados con diferentes polifenoles, estimulados con LPS como un modelo *in vitro* de inflamación.

Polifenol	Origen	Disolvente [%]	[ $\mu$ M]	Tipo tratamiento	Tiempo	Efectos	Referencia
<b>Daidzeína</b>	Soya	Etanol	$10^{-6}$	Pre-	1h	Disminuye IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$	(Liu y cols., 2009)
				Co-	4 días		
<b>Resveratrol</b>	Nueces, uvas, moras	No especificado	50	Pre-	30 min	Inhibe TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, iNOS/NO y NF- $\kappa$ B	(Lu y cols., 2010)
				Co-	24 h		
<b>Dimetil-fumarato</b>	Esteres de ácido fúmarico	0.1% DMSO	10	Pre-	30 min	Inhibe IL-6, TNF- $\alpha$ e iNOS	(Wilms y cols., 2010)
				Co-	6 h		
<b>4-O-metil onokiol Lignano</b>	Magnolia <i>Magnolia officinalis</i>	0.05 % Etanol	2	Co-	24 h	Reduce ERO's, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2	(Lee y cols., 2012)
<b>Catalpol</b>	Kaikai <i>Rehmannia glutinosa</i>	PBS	500	Pre-	1h	Atenúa cambio morfológico, inhibe act. iNOS, COX-2 y NF- $\kappa$ B	(Bi y cols., 2013)
				Co-	24 h		

### 3.5.2 Xantonas

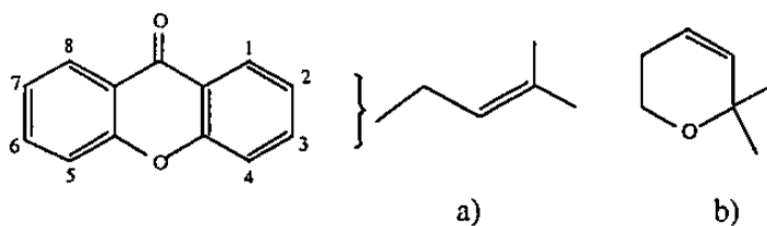
Las xantonas son un subgrupo de polifenoles que encontramos en diversas plantas como el mango y el mangostán, presentan un esqueleto básico derivado de la benzofenona. Tienen una estructura química única compuesta de un sistema aromático tricíclico (C3-C6-C6), y diversos grupos de tipo isoprenos, metoxilos e hidroxilos situados en varios lugares en los anillos A y B, dando lugar a una gran variedad de compuestos de xantonas<sup>55</sup>.

Tiene su origen en el producto de degradación de la fenilalanina: el ácido m-hidroxibenzoico (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) y su posterior condensación con tres unidades de malonato. Otra ruta alterna podría ser la combinación de una unidad C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, por ejemplo un ácido cinámico con dos unidades de malonato para obtener benzofenona (Imagen 5).



**Imagen 5.** Origen biosintético de las xantonas<sup>57</sup>.

El acoplamiento oxidativo podría conducir a la formación de la xantona. Las xantonas pueden ser simples o modificadas. En este último caso por la presencia de un sustituyente glicosídico o grupo prenilado (2,2 dimetilalil). Además por grado de oxigenación que presenten pueden ser clasificadas como mono, di, tri, o tetraoxigenadas<sup>56,57</sup> (Imagen 6).



**Imagen 6.** Esqueleto de la xantona y sus sustituyentes. a) sustituyente isoprenilo (2,2-dimetilalil), b) sustituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un -OH fenólico de la xantona<sup>57</sup>.

El estudio de las xantonas es interesante desde el punto de vista farmacológico, ya que recientemente se ha mostrado que las xantonas, al igual que otros polifenoles, poseen efectos diuréticos, antimicrobianos, antivirales, anti-tumorales, anti-ulcerosos, anti-hepatotóxicos, anti-leucemicas, cardiotónicos y supresores del SNC, también se ha observado la inhibición de la MAO-A y MAO-B<sup>58</sup>. Las xantonas comunmente estudiadas son la  $\alpha$ -  $\beta$ - y  $\gamma$ -mangostinas aisladas del fruto mangostán (*Garcinia mangostana* L.). Se ha informado que presentan actividad anticancerígena, antioxidante, anti-proliferativa, pro-apoptótica y anti-inflamatoria<sup>55</sup>. Se ha reportado que la  $\alpha$ -mangositna atenúa la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por LPS como TNF- $\alpha$  e IL-6 en macrófagos humanos U937, además mostraron que aminora la activación de varias vías de señalización incluyendo IL, MEK, JNK, ERK, STAT-1 y AP-1<sup>59</sup>. Las concentraciones utilizadas en estos estudios fueron desde 6 a 12 nM hasta 10-30  $\mu$ M<sup>59,60</sup>, pero las concentraciones del LPS diferían. También se demostró que  $\alpha$ -mangostina, en adipocitos humanos estimulados con LPS, inhibe la activación de MAPK, NF- $\kappa$ B y AP-1 y disminuye la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias. Además, se ha reportado que la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -mangostina inhiben NO y PGE<sub>2</sub> en macrófagos murinos RAW267.7. Estos efectos se asocian con cantidades disminuidas de mRNA de iNOS y COX-2<sup>61-63</sup>.

La belidifolina (1, 5, 8,-trihidroxi-3-metoxi-xantona), aislada de *Swertia japonica*, es un metabolito que inhibe selectivamente la monoamina oxidasa A y es un potente agente hipoglucemiante en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina<sup>64</sup>. La psorospermina, un epóxido dihidrofuranoxantona, aislado de las semillas y el tallo de la planta tropical africana *Psorospermum febrifugum*, exhibe una actividad significativa contra la leucemia y en modelos de tumores de mama y colon, además se ha demostrado que posee la capacidad de intercalarse con el DNA. En general, las xantonas y sus derivados también han demostrado ser inhibidores efectivos de las alergias y broncodilatadores en el tratamiento del asma<sup>65</sup>.

Así mismo, la caloxantona A aislada de las raíces y de la madera de *Calophyllum inophyllum*, conocido como “laurel alejandrino”, se ha demostrado que tiene efecto inhibitorio significativo contra *Salmonella aureus*, además produce depresión del SNC en ratas y ratones<sup>66</sup>. Otra especie de este género es el árbol tropical de América, *C. brasiliense* que produce una madera fuerte y durable, del cual han aislados entre otras moléculas, una variedad de xantonas

### **3.6 *Calophyllum brasiliense***

#### **3.6.1 Características de *C. brasiliense***

En América Latina, una de las especies más abundantes y ampliamente distribuidas es *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), esta es una planta medicinal conocida como “Barí”, “Santa María”, en Chiapas, “Cedro Cimarrón” en Oaxaca, “Guya” en Tabasco, “Palo María” en Nayarit, “Guanadí” en Brasil<sup>67</sup>. Esta planta ha sido usada en la medicina tradicional para tratar una amplia variedad de enfermedades como: bronquitis, afecciones hepáticas y gástricas, dolor, inflamación, diabetes, hipertensión, diarrea, herpes y reumatismo<sup>68,69</sup>.

#### **3.6.2 Descripción taxonómica.**

*C. brasiliense* es el único representante de su género en México, es un árbol perennifolio, que crece de 20 a 30 m de alto y llega a medir hasta 50 m (Imagen 7A), es dioico, algunos autores consideran que los arboles de *C. brasiliense* presentan flores masculinas y hermafroditas: andromonoicas. Las flores se encuentran en panículas axilares de 2.3 a 5 cm de largo, son blancas, numerosas y pequeñas, ligeramente fragantes, actinomorfas (Imagen 7B); con frutos de tipo drupa de 1.8 a 3 cm de largo, aunque también ha sido clasificada como baya; semillas ovoides o esféricas de 1.7 a 2.2 cm de largo y ancho, de color blanco amarillentas y sin endospermo (Imágenes 7C y 7D)<sup>68,70</sup>



**Imagen 7.** Ejemplar de *Calophyllum brasiliense*. A) Árbol adulto, B) inflorescencia en forma de panícula, C) frutos inmaduros, y D) semillas maduras tipo drupa.

La anatomía foliar presenta nervaduras laterales paralelas entre sí y perpendiculares a la nervadura central. Mediante métodos histoquímicos se ha determinado que los compuestos fenólicos están presentes en pequeñas cantidades en las hojas, el tallo, y son evidentes en la epidermis, la corteza, los radios del parénquima y la médula; otros autores también los reportan en el tallo, el peciolo y especialmente en los conductos secretores<sup>68,70</sup>. La anatomía y propiedades físicas de la madera de *C. brasiliense* se describe de textura fina, con poros de distribución difusa, parénquima paratraqueal, radios tipo III y las fibras tienen potencial para elaboración de papel<sup>68</sup>.

### **3.6.3 Hábitat de *C. brasiliense*.**

Crece de forma silvestre principalmente en selva baja, mediana y alta perennifolia, aunque también crece en bosque de encino, pino-encino, bosque tropical subcaducifolio y caducifolio, se desarrolla sobre pendientes ligeras o pronunciadas, en cañadas y a orilla de las carreteras. Prospera en suelos de material calizo, ígneo y metamórfico. Entre las ocho especies del género encontradas en el continente americano, *C. brasiliense* es la que presenta una distribución amplia<sup>68</sup>.



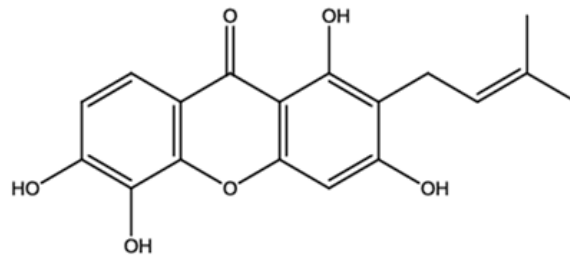
## 4. Justificación

La astrogliosis excesiva y crónica participa en el proceso de inflamación del SNC contribuyendo al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, debido al aumento en la producción de citocinas y otros mediadores pro-inflamatorios que favorecen a la muerte neuronal.

En estudios recientes se ha sugerido el uso de fitomedicamentos como los polifenoles pueden retrasar o incluso prevenir la aparición de enfermedades del SNC. Los polifenoles representan un grupo amplio de moléculas, y son reconocidos por sus efectos biológicos y farmacológicos, poseen propiedades antivirales, anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas y anti-inflamatorias. También, se ha demostrado que estos compuestos conforman nuestra dieta cotidiana y que la incidencia de enfermedades crónicas está inversamente relacionada con el consumo de frutas y verduras ricas en polifenoles<sup>48,52,71,72</sup>.

Los polifenoles de tipo xantonas se han aislado del duramen y hojas de *C. brasiliense*. El duramen de *C. brasiliense* es conocido por ser altamente resistente a hongos y termitas. A los extractos metanólicos, acetónicos y acuosos de 83%, 59% y 21% respectivamente se les encontró actividad inhibidora del crecimiento de hongos, de esos extractos se aislaron cinco xantonas preniladas: 6-desoxijacareubina (I), 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona (II), jacareubina (III) y 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V). Las xantonas III, IV, y V, fueron las más abundantes e inhibieron a 0.25 mg/ml el crecimiento micelial de *Postia placenta*. La actividad inhibitoria de estas xantonas fue del rango de 55.5% para la xantona V y hasta 68.8% para la mezcla de xantonas III y IV<sup>73</sup>. Además, algunas xantonas aisladas de este árbol, han mostrado que pueden actuar como sustratos y tener actividad inhibidora de las sulfotransferasas SULT1A1 y SULT2A1<sup>74</sup>. También, Reyes-Chilpa y cols., 2006, mostraron que las xantonas 1, 2, 3, y 4 inhiben la enzima K<sup>+</sup>-ATPasa gástrica, aislada del estómago de perro, lo cual podría explicar las propiedades gastroprotectoras indicadas por la medicina tradicional<sup>75</sup>.

La 1, 3, 5, 6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil) xantona, o xantona V, (Imagen 8) aislada de *C. brasiliense* tiene actividad citotóxica contra levaduras y bacterias patógenas por el ácido brasiliensico<sup>68</sup>.



**Imagen 8.** Estructura química de 1, 3, 5, 6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil) xantona ó xantona V

Recientemente en nuestro equipo de trabajo, se examinó el efecto protector de las xantonas III y V contra el efecto citotóxico inducido por  $\text{FeSO}_4^-$  en homogenados de cerebro, hígado y riñón de rata. La xantona V mostró una mejor capacidad de atrapar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{OH}^{\bullet}$  que la xantona III, además ambas previenen la degradación de DNA y de albúmina inducida por el sistema generador  $\text{OH}^{\bullet}$ , disminuyen la lipoperoxidación y la producción de ROS inducida por  $\text{FeSO}_4^-$  en todos los tejidos, disminuyen la actividad de la glutatión reductasa inducida por el estímulo pro-oxidante en homogenados cerebrales<sup>76</sup>. Estos resultados sugieren que las xantonas III y V tienen actividad antioxidante.

Dado que la activación y proliferación astrogial inducida por distintas patologías inflamatorias tanto agudas como crónicas puede contribuir al daño neuronal y a que en estudios recientes se ha sugerido el uso de fitomedicamentos como profilácticos, en este trabajo se propone dilucidar si la xantona V modula marcadores inflamatorios en un modelo *in vitro* de astrocitos corticales de ratas neonatas

## 5. HIPÓTESIS

Si los polifenoles con actividad antioxidante presentan actividad anti-inflamatoria, entonces la xantona V inhibirá de manera significativa la producción de proteínas pro-inflamatorias inducidas por la exposición a LPS en astrocitos corticales de ratas neonatas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Dilucidar el efecto de la xantona V sobre la producción de proteínas pro-inflamatorias mediante la vía de señalización de NF- $\kappa$ B activada por LPS en astrocitos corticales de ratas neonatas en cultivo primario.

### 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Determinar la toxicidad de la xantona V en astrocitos corticales de ratas neonatas.
- b. Estandarizar el modelo inflamatorio con LPS de *Salmonella abortus equi* en cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatas. Establecer los siguientes parámetros:
  - i. Acondicionamiento de los astrocitos
  - ii. Tiempo de incubación
  - iii. Concentración
- c. Establecer el efecto modulador de la xantona V sobre proteínas involucradas en los procesos inflamatorios:
  - i. GFAP,
  - ii. Subunidad p65 de NF- $\kappa$ B,
  - iii. TNF- $\alpha$ ,
  - iv. COX-2 e
  - v. iNOS

## 7. MÉTODOS

### 7.1. Cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatas.

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se realizaron siguiendo el método de McCarthy y De Vellis, 1980<sup>77</sup>, con algunas modificaciones<sup>78</sup>. Los cultivos se obtuvieron a partir de cortezas cerebrales de ratas neonatas de la cepa Wistar. El cerebro extraído se mantuvo en HBSS, (tabla 4) se retiraron estructuras no corticales y las meninges para proceder a una disociación mecánica utilizando pipetas de diferente diámetro para separar agregados. Se incubó por 15 min a 37°C, la suspensión se centrifugó a 250 g por 10 min y el sobrenadante fue decantado. Las células disociadas se re-suspendieron en medio DMEM (tabla 5). Las células se sembraron en cajas de 75 cm<sup>2</sup> pre-tratadas con poli-D-lisina, (SIGMA P0899; 1:50) y mantenidas a 37°C, humedad controlada y 5 % de dióxido de carbono. El medio de cultivo se cambió luego de 24 h y después cada cuatro días.

**Tabla 4.** Composición de la HBSS libre de calcio y magnesio.

Reactivo	Concentración mM
Cloruro de Sodio (NaCl)	138
Cloruro de Potasio (KCl)	5.4
Fosfato de Sodio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.044
Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	5.56
Fosfato de Sodio Dibásico anhidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro)	0.34
Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	4.2
Rojo Fenol	0.001 %

**Tabla 5.** Complementos del medio DMEM.

Reactivo	Concentración
DMEM	17.5 g/l
Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	3.5 g/l
FBS	10 %
Antibiótico/ antimicótico	1 %

Entre el día 12 y 15, cuando los cultivos fueron confluentes, las cajas se agitaron durante 15 h para remover microglía. Enseguida los frascos fueron tratados con 0.5 % de tripsina (tabla 6) para facilitar el desprendimiento de los astrocitos, y utilizarlos en los experimentos correspondientes.

El número de células de los diferentes experimentos fueron sembradas de la siguiente forma: Para la prueba de viabilidad 10 000 cels/pozo en placas de 96 pozos, para experimentos de expresión de proteínas mediante Western-Blot 100 000 cels/pozo,; y en placas de 8 pozos para los experimentos de inmunocitoquímica (4 000 cels/pozo), para las pruebas de inmunofluorescencia se ocuparon cajas de 12 pozos (50 000 cels/pozo) y de 24 pozos (25 000 cels/pozo) con cubreobjetos de 10 y 12 mm respectivamente.

**Tabla 6.** Composición de la tripsina (0.5 %) en HBSS libre de calcio y magnesio.

Reactivo	Concentración g/l
Tripsina	0.5
EDTA	2

### 7.1.1. Inmunocitoquímica

Se ha reportado que la GFAP se expresa especialmente en los astrocitos del CNS, lo que lo hace un buen marcador molecular para este tipo celular y fue utilizado en este trabajo en primera instancia para identificar la pureza de los cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatas, mediante una inmunocitoquímica para mostrar los astrocitos positivos a GFAP.

Los cultivos de astrocitos se lavaron con PBS frío (tabla 6), y se fijaron con 3.7 % de paraformaldehído en PBS durante una hora a 4°C. Después de lavar el fijador con PBS, las células se permeabilizaron con Citrato de Sodio 1 M, posteriormente se lavaron con PBS y se procedió a la incubación del anticuerpo primario GFAP [1:50-anti-conejo]; según las indicaciones de usuario del Kit Super Sensitive Polymer-HRP Detection System A Biotin-Free Detection System (BioGenex). Las fotos fueron tomadas en un microscopio de luz Zeiss (Axiovert 40C) con ayuda del programa AxioVision.

**Tabla 7.** Composición de PBS, pH 7.4.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración mM</b>
Fosfato de sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.01
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.5
Cloruro de Sodio (NaCl)	7.5
Cloruro de Potasio (KCl)	143.1

## **7.2. Obtención de la xantona V**

El árbol *Calophyllum brasiliense* fue colectado e identificado por J. I. Calzada de la Selva Lacandona, Chiapas, México; la etiqueta JIC-3116 y la madera simple (00011-XALw) fueron depositados en el Herbario Xal y Xylarium Dr. Faustino Miranda, ambos del Instituto de Ecología, A. C. en Xalapa, Ver.<sup>73</sup>.

La xantona V fue aislada del duramen de *C. brasiliense*, obtenida de los extractos metanólicos e identificados por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas como describe Estrada-Muñiz, 1998<sup>57</sup>.

## **7.3. Efecto de la xantona V en la viabilidad celular**

### **7.3.1. Ensayo de MTT**

Esta técnica colorimétrica se basa en la cuantificación de las sales de formazán, productos insolubles de color morado, generados a partir de la reducción metabólica del MTT, un compuesto soluble capaz de incorporarse principalmente a las mitocondrias por la acción de enzimas deshidrogenasas en presencia de NADH, permitiendo establecer la actividad de las deshidrogenasas de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para determinar supervivencia y proliferación celular<sup>41,79</sup>.

Para realizar esta prueba, se sembraron astrocitos a una densidad de 4 000 cels/pocillo en placas de 96 pocillos. A los cuales se les administró 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 µM de xantona V

disuelta en EtOH absoluto para obtener una concentración final de 0.005 %; estas concentraciones fueron seleccionadas por su efecto antioxidante previamente evaluado por nuestro equipo de trabajo<sup>76</sup>, y se dejaron incubar durante 48 h. Se incluyó un grupo de células control a las cuales solo se les cambió medio de cultivo. Cabe mencionar, que antes y después de la prueba, los cultivos fueron monitoreados mediante observación al microscopio para asegurar el valor resultante de citotoxicidad.

Al iniciar la técnica, los astrocitos se lavaron una vez con PBS y se dejaron incubar con MTT (0.5 mg/ml, disuelta en HBSS sin calcio, ni magnesio, y sin rojo fenol (tabla 3); 100 µl a cada pocillo) a 37°C durante una hora, para dar lugar a la formación de formazán. La solución de MTT no transformada fue eliminada mediante lavados con PBS frío (tabla 4), y el formazán insoluble fue disuelto con 200 µl de DMSO. La lectura de las muestras se realizó en un microlector de placas (570 nm). El porcentaje de células viables se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Células viables} = (A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

#### **7.4. Estandarización del modelo inflamatorio.**

Debido a la variabilidad en los protocolos inflamatorios con LPS, como agente tóxico sobre astrocitos corticales en cultivo primario encontrados en la bibliografía, se llevó a cabo una exploración de las condiciones experimentales óptimas con el LPS de *Salmonella abortus equi*.

Después de 72 h de la siembra, las células se emplearon para la estandarización del protocolo inflamatorio. Con base en la literatura científica, se preparó una solución stock a una concentración de 1 mg/ml de LPS, disuelta en agua bidestilada. Para determinar la dosis óptima los estímulos se realizaron con tres concentraciones: 1, 10 y 100 µg/ml; previo al estímulo de LPS se acondicionaron las células con DMEM disminuyendo el FBS a 1 %, método comúnmente utilizado por otros autores<sup>42</sup> para inhibir la proliferación celular; después, se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente se realizaron inmunocitoquímicas para conocer el efecto del LPS sobre p65 de NF-κB (1:50-anti-ratón).

Con los resultados preliminares, se decidió mantener a los cultivos con DMEM acondicionado con 10 % de FBS previo al estímulo, como lo han reportado otros autores<sup>39,40</sup>, con las mismas concentraciones anteriores de LPS durante 48 h.

#### 7.4.1. Inmunocitoquímica

Posteriormente, se realizó la técnica de inmunocitoquímica contra p65 de NF- $\kappa$ B, como anteriormente se ha descrito.

Con el dato obtenido se prosiguió a cuantificar la expresión de TNF- $\alpha$ , por Western-Blot, pues se sabe que cuando se activa p65, ésta se une al DNA y se induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ .

#### 7.4.2. Western Blot

Los cultivos celulares se lisaron de acuerdo a Torres-Ramos y cols., 2011<sup>78</sup>; con 80  $\mu$ l/cm<sup>3</sup> de buffer de Laemli 3x (tabla 8), directo en el plato.

**Tabla 8.** Composición de Buffer de Laemli 3x.

Reactivo	Concentración
Tris HCl (1M) pH 6.8	50 mM
SDS	2 %
Glicerol	10 %
Bromofenol blue	0.1 %
Agua bidestilada	15 %
$\beta$ -mercaptoetanol	1.5 %

Estos lisados se desnaturalizaron a 95°C en baño maría durante 20 min y las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12% (tablas 9 y 10).



**Tabla 9.** Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.

<b>Gel separador</b>			<b>Gel concentrador</b>	
<b>Sustancia/ porcentaje</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>Sustancia</b>	<b>Concentración</b>
Agua destilada	4.35 ml	3.35 ml	Agua destilada	6.1 ml
Tris 1.5 M-pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	Tris 1.5 M-pH 6.8	2.5 ml
SDS10 %	100 µl	100 µl	SDS 10 %	100 µl
Bis-Acrilamida 30 %	3 ml	4 ml	Bis-Acrilamida 30 %	1.3 ml
Persulfato de amonio (APS) 10 %	50 µl	50 µl	Persulfato de amonio (APS) 10 %	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	TEMED	10 µl

**Tabla 10.** Composición del Buffer de corrida para electroforesis.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración mM</b>
Glicina	251
Tris base	25
SDS	0.7

Las proteínas se transfirieron (tabla 11) a una membrana de nitrocelulosa y se llevó a cabo la inmunodetección por Western-Blot con el anticuerpo primario: TNF- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) y su secundario correspondiente anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology, 1:50 000); por último, se realizó el control de carga con  $\beta$ -actina y su secundario correspondiente anti-ratón; para llevar a cabo la detección mediante quimioluminiscencia (tablas 12 y 13).

**Tabla 11.** Composición del buffer de transferencia.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración mM</b>
Glicina	0.39
Tris base	0.48
SDS	1.29

**Tabla 12.** Características del anticuerpo primario TNF- $\alpha$  utilizado en Western Blot.

Primario	Casa comercial	P. M kDa	Tamaño gel	Concentración	Disolvente
TNF- $\alpha$	Abcam	54	12 %	1: 1 000	Leche 2.5 % en TBS

**Tabla 13.** Características del anticuerpo secundario respectivo utilizado en Western Blot.

Secundario	Casa comercial	Concentración	Disolvente
Goat policlonal	Jacksson	1: 30 000	TBS

Con el dato obtenido de este ensayo se decidió usar una concentración intermedia de 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ : 50  $\mu\text{g/ml}$ , para estimular a los astrocitos durante 48 h.

## 7.5. Efecto de la xantona V en el modelo inflamatorio

Basados en los resultados obtenidos en la estandarización del modelo inflamatorio con LPS en los cultivos de astrocitos corticales de ratas neonatas y de la viabilidad celular de la xantona V en los astrocitos, estos fueron expuestos por una hora de pre-tratamiento con la xantona V en concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , pasado el tiempo del pre-tratamiento, se añadió 50  $\mu\text{g/ml}$  de LPS y se dejó incubar durante 48 h, en co-tratamiento. Posteriormente, las células fueron preparadas como se describe más adelante para las técnicas de inmunofluorescencia y Western-Blot.

### 7.5.1. Inmunofluorescencias

La inducción anormal de GFAP se considera nociva para la regeneración del CNS debido a que los astrocitos reactivos positivos a este marcador molecular, van a impedir el establecimiento de contactos neuronales normales, y participar en el proceso de inflamación, entre otros <sup>80</sup>. En relación a esta información previa, se prosiguió a probar el efecto que tiene el LPS, y la xantona V sobre la expresión de GFAP mediante inmunofluorescencias.

Una vez concluido el pre- y co-tratamiento de la xantona V y el LPS, se lavaron las células con PBS frío, dos veces. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 20 min a 4°C,

posterior a este tiempo se permeabilizaron con metanol frío durante 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; se lavaron las células con PBS frío tres veces suavemente. Se realizó el bloqueo a temperatura ambiente con 2 % de BSA en PBS frío durante una hora, y se dejó incubando GFAP, (anti-conejo; 1:100 en BSA 2 %) por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad. A continuación, se prosiguió a lavar nuevamente con PBS frío tres veces y se dejó incubar el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-conejo (A21206) 1:200 en PBS, a temperatura ambiente, en oscuridad durante una hora. Por último, las muestras se montaron con solución de montaje con DAPI, marcador nuclear, (Vecta shield, H-1200).

También, se ha demostrado que la activación de NF- $\kappa$ B es vital para la regulación de la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias inducidas por LPS u otras respuestas inflamatorias, es por esto que se investigó el efecto de la xantona V en la activación de la subunidad de NF- $\kappa$ B: p65 (1-100 en BSA 2 %,) anti-ratón (Alexa Fluor 568 anti-ratón (A11031) en PBS), mediante la técnica de inmunofluorescencia anteriormente descrita.

Además, en términos de neuroinflamación, se ha sugerido que la activación de NF- $\kappa$ B, inducida por LPS, aumenta la expresión de citocinas como TNF- $\alpha$ , por esto, se decidió conocer el efecto que tiene la xantona V sobre esta citocina mediante la misma técnica. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , posterior a este tiempo se permeabilizaron con metanol durante 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; se lavaron las células con PBS frío tres veces suavemente. Se realizó el bloqueo a temperatura ambiente con 4 % de suero normal de cabra (NGS) en PBS frío durante una hora, y se dejó incubando TNF- $\alpha$ , (anti-cabra; 1:100 en NGS 4 %) por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad. A continuación, se prosiguió a lavar nuevamente con PBS frío tres veces y se dejó incubar el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 568 anti-cabra (A11057) 1:200 en PBS), a temperatura ambiente y en oscuridad durante una hora.

La activación de NF- $\kappa$ B activa varios genes, entre ellos iNOS, molécula responsable de la síntesis de óxido nítrico presente en el CNS en respuesta a lesiones, el óxido nítrico es un importante mediador inflamatorio que está presente en las células después de una estimulación con LPS, los niveles excesivos de esta molécula puede conducir a la neurodegeneración. Por eso, se buscó el efecto de la xantona V en la expresión de iNOS (1:100 en 2 % de BSA en PBS;

anti-conejo: Alexa Fluor 488 anti-conejo (A21206) en PBS 1:200) mediante inmunofluorescencia (Tabla 14). Las fotos fueron obtenidas de un microscopio de inmunofluorescencia Leica DMLS.

**Tabla 14.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencias.

<b>Primarios (1:100) en solución de bloqueo</b>	<b>Solución de bloqueo</b>	<b>Secundarios (1:200) en PBS</b>
GFAP, i-NOS	BSA 2%	Alexa Fluor 488 anti-conejo/ A21206
p65	BSA 2%	Alexa Fluor 568 anti-ratón/A11031
TNF- $\alpha$	NGS 4%	Alexa Fluor 568 anti-cabra/A11057

### 7.5.2. Western-Blot

Dado que COX-2 es una enzima clave para la producción de PGE<sub>2</sub>, la cual es una molécula involucrada en el proceso pro-inflamatorio, se investigó el efecto de la xantona V sobre COX-2 inducida por LPS, mediante Western Blot. Los lisados celulares se desnaturalizaron a 95°C en baño maría durante 20 min y las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10 % (tabla 9 y 10). Las proteínas se transfirieron (tabla 11) a una membrana de nitrocelulosa y se llevó a cabo la inmunodetección por Western-Blot con el anticuerpo primario: COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) y su secundario correspondiente anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology, 1:50 000); por último, se realizó el control de carga con  $\beta$ -actina y su secundario correspondiente anti-ratón; para llevar a cabo la detección mediante quimioluminiscencia (tablas 12 y 13).

### 7.6. Análisis de imágenes

La cuantificación de la expresión de las proteínas mediante la obtención de las imágenes de inmunofluorescencias, se realizaron con el programa Image J de la siguiente manera:

Una vez abierto el archivo, de la barra de marcadores se seleccionó la opción *Image* → *Color* → *Split Channels*. Se escogieron el color del filtro de la expresión de la proteína: verde o rojo y del marcaje de los núcleos con DAPI en azul, para identificar las células.

Con la opción *Freehand selections*, se trazó el contorno de una célula de la imagen, en la opción *Analyze* → *Tools* → *ROI Manager* → *Add* se guardaron los contornos seleccionados de cada

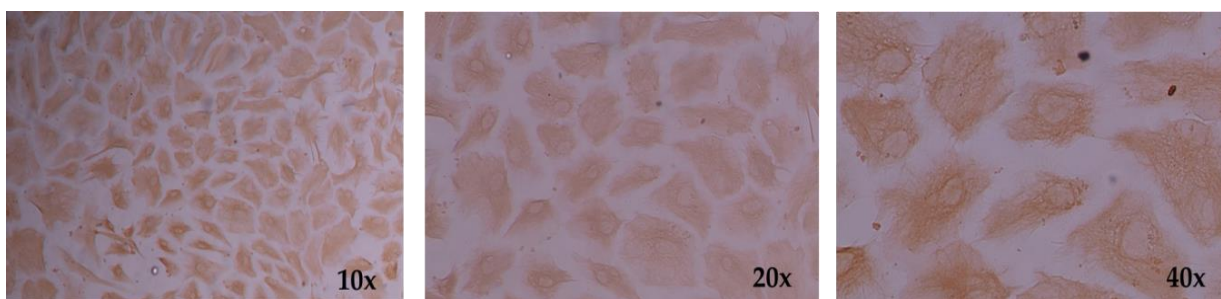
célula de la imagen. En ese recuadro: *ROI Manager*→ *Measure*→ Ventana de la obtención de valores de las medias, área y perímetro, datos que se guardaron en una hoja Excel para procesar los datos en GraphPad Prism 5.0 en porcentajes y sus respectivas gráficas. Se seleccionaron 100 células, por cada tratamiento.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Estandarización del modelo inflamatorio *in vitro*.

#### 8.1.1. Caracterización de los astrocitos corticales de ratas neonatas.

Se realizaron inmunocitoquímicas para identificar a las células positivas al anticuerpo de GFAP. Después de 14 días, el cultivo presentó más del 97 % de células positivas para GFAP (Figura 1) demostrando que los astrocitos fueron el tipo celular predominante.



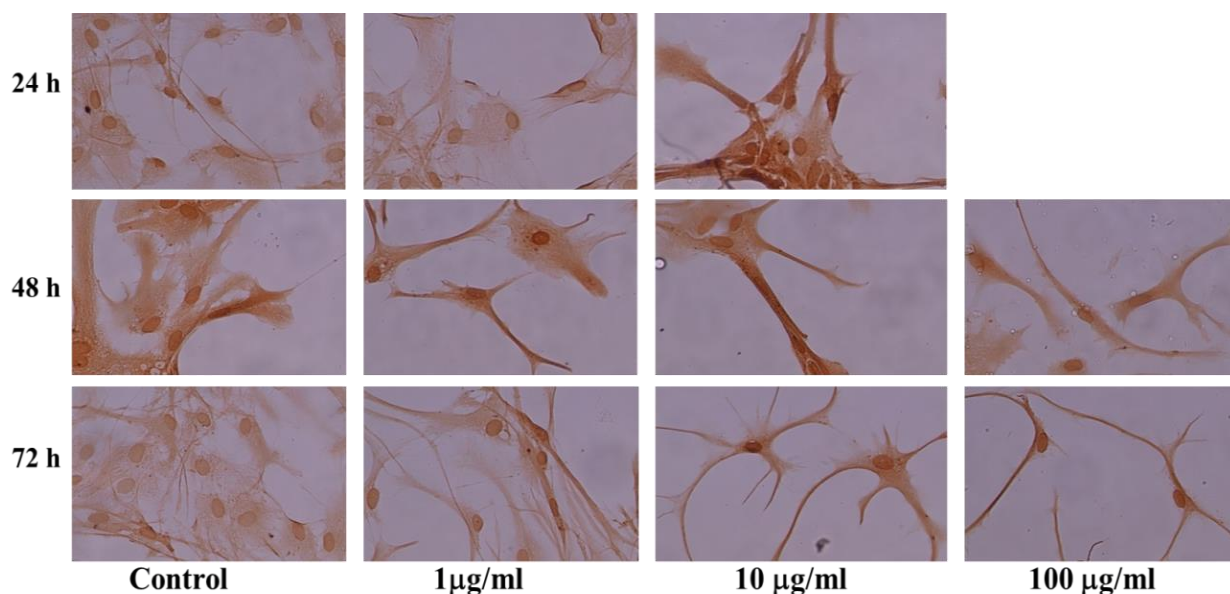
**Figura 1.** Caracterización del cultivo primario de astrocitos corticales de ratas neonatas. El cultivo primario de células corticales presentó más del 97 % de células positivas a GFAP (marca café), indicando la pureza del cultivo de astrocitos. Las fotos de las inmunocistoquímicas fueron tomadas en un microscopio Zeiss (Axiovert 40C) en aumento de 10x, 20x y 40x con ayuda del programa AxioVision.

## 8.2. ETAPA 1. Modelo inflamatorio en cultivo de astrocitos corticales de ratas neonatas.

### 8.2.1. La disminución de suero bovino fetal (FBS) induce astrogliosis.

La disminución de suero a 1% provocó cambios morfológicos en los controles de los tres tiempos de incubación, evidenciado por la prolongación del citoplasma de los astrocitos, y el aumento en la expresión de la proteína p65, además, la marca intensa en el núcleo de color café sugiere su translocación nuclear.

La concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  expresó más p65 a 48 h, predominantemente nuclear, observándose también marca importante en el citosol; el mismo caso sucedió a 10  $\mu\text{g/ml}$  en los tratamientos de 24 h y 72 h, también hubo un cambio morfológico notable. El cambio morfológico descrito y la mortalidad celular observadas en el microscopio (dato no mostrado), fueron más pronunciados a 100  $\mu\text{g/ml}$  en los dos tiempos de tratamiento (Figura 2).



**Figura 2.** Astrogliosis inducida por la disminución de SBF. En las fotografías de las inmunocitoquímicas se observa el cambio morfológico y la expresión de p65 en los astrocitos corticales de ratas neonatas incubadas con DMEM + 1 % FBS y con 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de LPS de *Salmonella abortus equi* durante 24, 48 y 72 h.

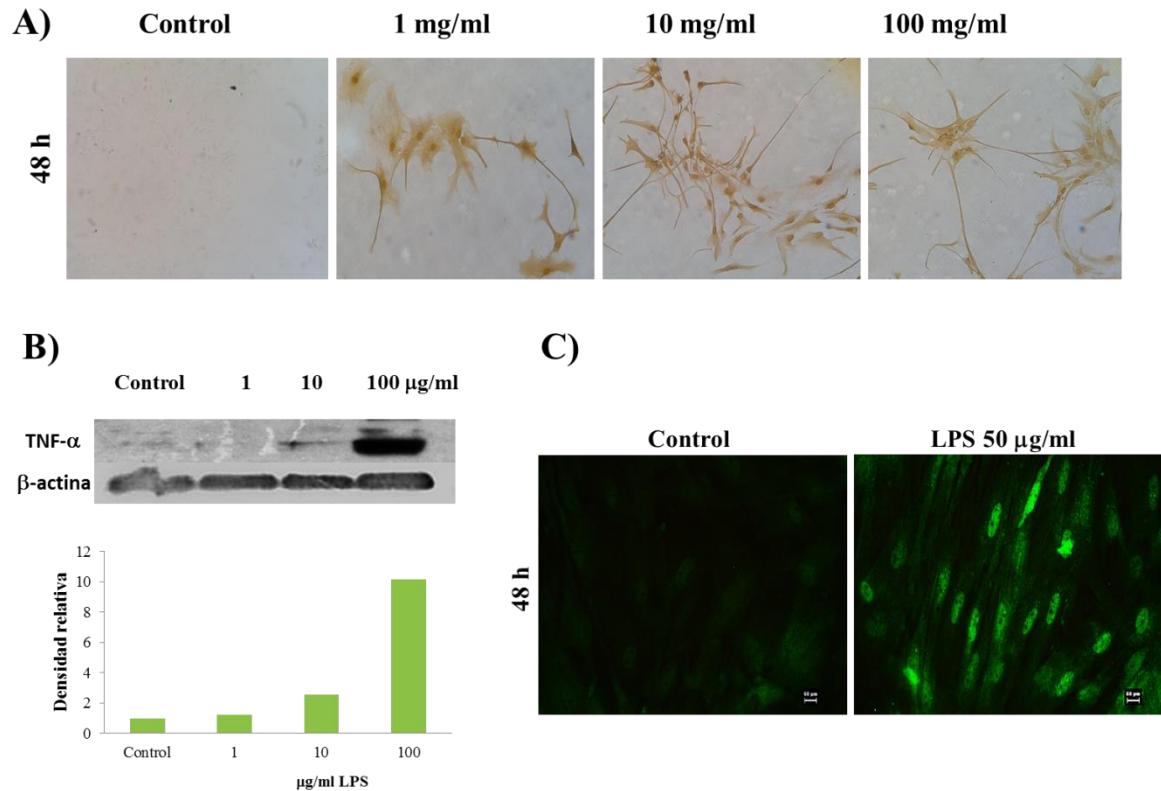
### **8.2.2. El LPS induce la expresión de p65 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).**

Los astrocitos mantenidos con DMEM acondicionado con 10 % de SBF y sin estimular con el agente tóxico, no muestran cambio morfológico, ni en la expresión de p65 mediante la inmunocitoquímica; sin embargo, las células estimuladas con LPS si presentaron cambios morfológicos, además del notable aumento en la expresión de p65 respecto a su control (Figura 3A), lo cual indica que la astrogliosis es inducida exclusivamente por el LPS.

Para confirmar el aumento de marcadores inflamatorios inducidos por LPS, se prosiguió a cuantificar la expresión de TNF- $\alpha$  mediante Western-Blot. El resultado indica que los niveles de expresión aumentan considerablemente cuando los astrocitos corticales de ratas neonatas se exponen a 100  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 48 h (Figura 3B), lo cual coincide con el aumento de la p65 vista por inmunocitoquímica<sup>81</sup>.

Debido a que la concentración de LPS a 100  $\mu\text{g/ml}$  aumenta la expresión de marcadores inflamatorios en los astrocitos y disminuye el número de células vivas, observado al microscopio (dato no mostrado) provocado por el tratamiento, se evaluó la concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante de 48 h para determinar la expresión de p65 con la técnica de inmunofluorescencia, técnica que sería usada en todos los experimentos de la segunda etapa de este trabajo. La concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  fue capaz de aumentar la expresión de p65 (marcaje verde), Figura 3C.





**Figura 3.** Expresión de proteínas marcadoras inflamatorias inducidas por LPS. **A)** El aumento en la expresión de p65 en astrocitos corticales de rata fue consistente en los cultivos incubados con DMEM y 10 % de FBS y tratados con diferentes concentraciones de LPS por 48 h, la marca café intensa en el núcleo sugiere la translocación de p65. **B)** Aumento de la expresión de la proteína TNF- $\alpha$  mediante Western-Blot, confirmando los resultados de la inmunocitoquímica. **C)** Expresión de p65 inducida por 50  $\mu$ g/ml de LPS con la técnica de inmunofluorescencia.

**RESULTADO FINAL DE LA PRIMERA ETAPA:** Las condiciones experimentales óptimas del modelo de inflamación *in vitro* en cultivo primario de astrocitos corticales de ratas neonatas están resumidas en la tabla 15.

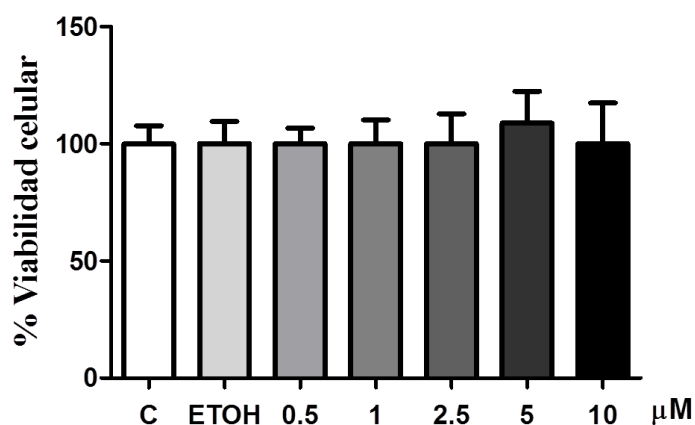
**Tabla 15.** Condiciones experimentales finales del modelo inflamatorio con LPS en astrocitos corticales de ratas neonatas en cultivos primarios

Cepa	[LPS]	Modelo	FBS	Tiempo incubación
<i>Salmonella abortus equi</i>	50 $\mu$ g/ml	Corteza de ratas Wistar neonatas	10 %	48 h

### 8.3. ETAPA 2. Modulación de marcadores inflamatorios por la xantona V.

#### 8.3.1. La xantona V mantiene la viabilidad celular.

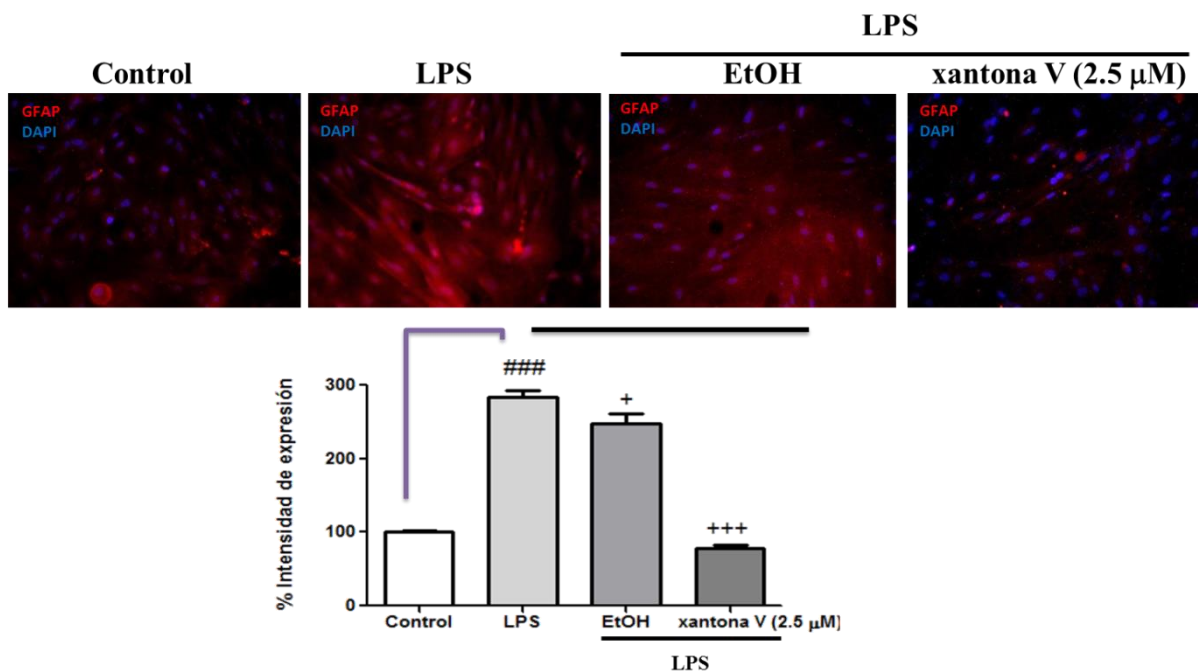
Se realizaron experimentos para determinar la citotoxicidad de la xantona V en las concentraciones propuestas para este estudio, con el fin de determinar si el polifenol alteraba la viabilidad celular. Los resultados muestran que la xantona V mantiene la viabilidad de los astrocitos en todas las concentraciones evaluadas (Figura 4).



**Figura 4.** Viabilidad celular de la xantona V. La xantona V mantiene la viabilidad celular en los astrocitos corticales de ratas neonatas de cultivos primarios, tratados con 0.1, 1, 2.5, 5 y 10 μM durante 48 h. La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos independientes por triplicado.

### 8.3.2. El incremento de la proteína acidica fibrilar glial (GFAP) inducido por LPS, es inhibido por la xantona V.

Como se esperaba, en los astrocitos tratados con LPS se observa un importante incremento de la expresión de GFAP con respecto al control. Los resultados mostraron que el EtOH inhibe la expresión de GFAP en un 13 % con respecto al LPS, y que la xantona V inhibe el 72.5 % de la respuesta inducida por el LPS (Figura 5).

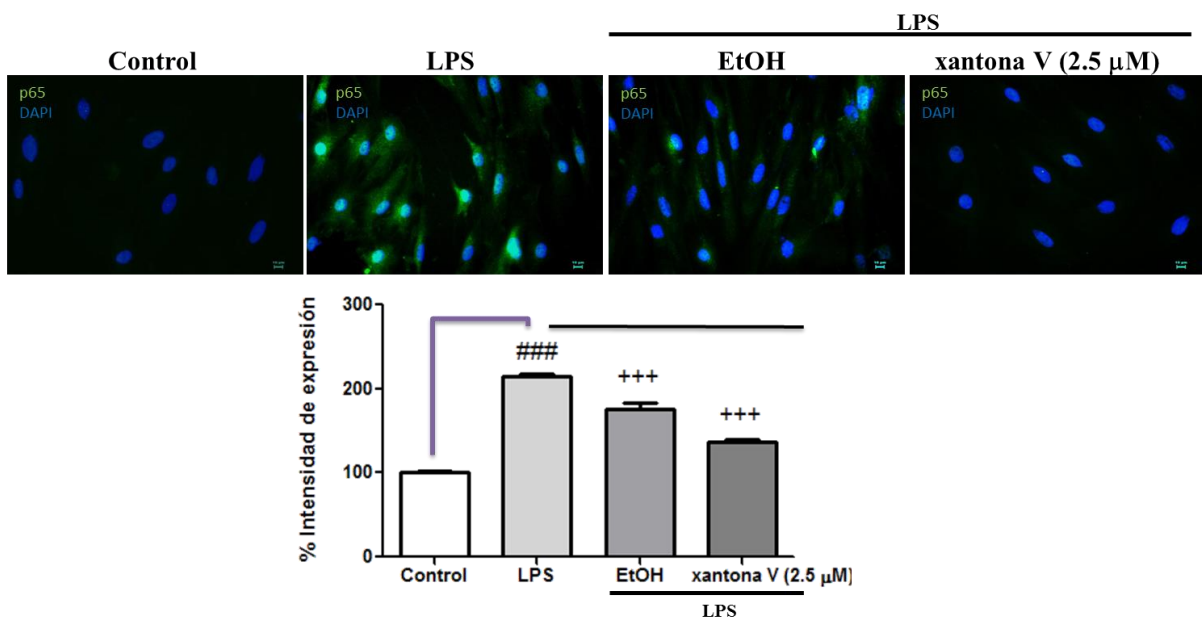


**Figura 5.** La xantona V inhibe la expresión de GFAP inducida por el LPS. El LPS a 50 μg/ml incrementa dos veces más la expresión de GFAP en los astrocitos corticales de rata (marcaje rojo), la marca azul representa a los núcleos celulares. El EtOH inhibe el 13 % de expresión con respecto al LPS. Además, la xantona V a 2.5 μM inhibe el 72.5 % la expresión de GFAP inducida por LPS. La gráfica representa el porcentaje de intensidad de expresión de la proteína de cada tratamiento. ### Diferencia significativa del grupo control; +++ diferencia significativa del grupo LPS ( $p \leq 0.05$ ).

### 8.3.3. El incremento de p65 inducido por LPS, es inhibido por la xantona V.

En las imágenes de inmunofluorescencias se observó un aumento en la expresión p65 en el citosol y la co-localización nuclear en las células tratadas con LPS incubadas durante 48 h (Figura 6). El EtOH inhibe el 18 % de la expresión de p65 citosólica y la co-localización nuclear inducida por LPS. También, la xantona V a 2.5  $\mu$ M inhibe el 36 % de la expresión de p65 inducida por LPS.

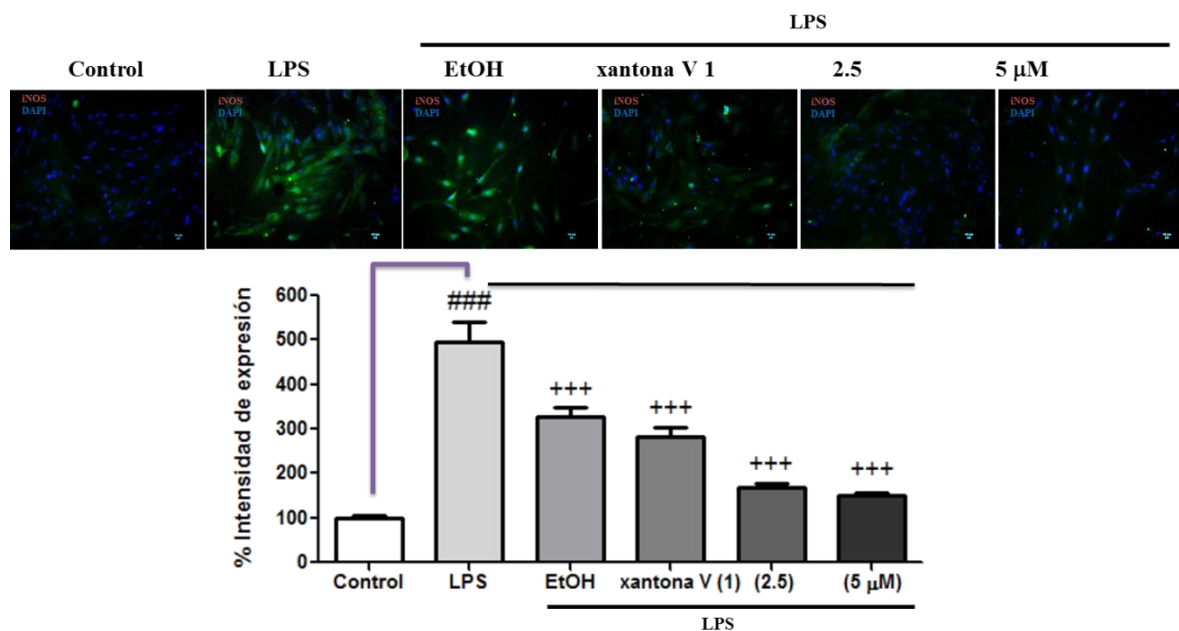
Este dato sugiere que la actividad inhibitoria de la expresión de p65 puede estar dada por un efecto sinérgico de la xantona V y del EtOH.



**Figura 6.** La xantona V y el EtOH inhiben la expresión de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B inducida por LPS. El LPS induce el aumento de la expresión citosólica de p65 (marca verde) y su co-localización nuclear (marca azul claro); el EtOH inhibe la expresión de esta proteína hasta un 18 % y la xantona V la inhibe al 36 % con respecto al estímulo. ### Diferencia significativa del grupo control; +++ diferencia significativa del grupo LPS ( $p \leq 0.05$ ).

### 8.3.4. La xantona V inhibe el incremento de la Óxido Nítrico sintasa inducible (iNOS) inducido por el LPS.

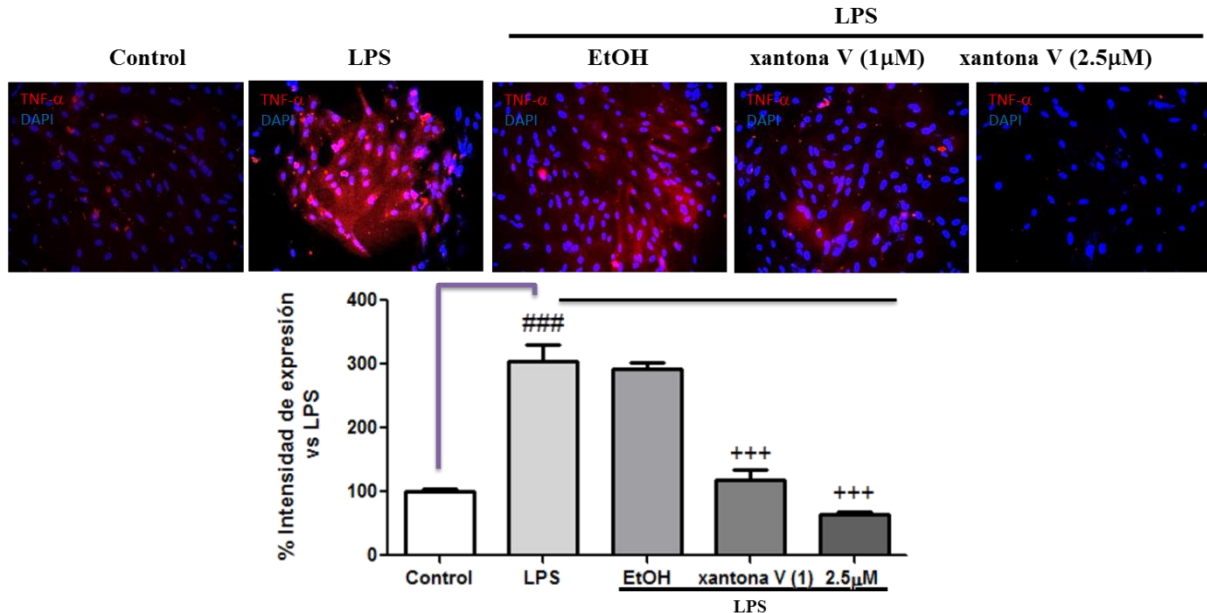
El LPS aumento casi cuatro veces la expresión de iNOS. El EtOH inhibe un 34 % de la expresión de iNOS inducido por el LPS. Sin embargo, la xantona V inhibió la expresión de iNOS de manera dosis-dependiente de la concentración independientemente del EtOH, hasta conservar las condiciones basales: a 1  $\mu\text{M}$  (43 %), 2.5  $\mu\text{M}$  (65 %) y 5  $\mu\text{M}$  (70 %), Figura 7. Estos resultados sugieren que la xantona V puede inhibir la expresión iNOS inducido por LPS de forma dependiente de la concentración y posiblemente en sinergia con el EtOH.



**Figura 7.** La xantona V inhibe la expresión de iNOS inducida por el LPS. En las inmunofluorescencias se observa que el LPS induce el incremento en la expresión de iNOS (marca verde) y que los tratamientos de xantona V, inhiben el efecto que el LPS tiene sobre esta proteína. La marca azul representa a los núcleos celulares. Estos resultados se representan mejor en la gráfica de los porcentajes de expresión de iNOS de las inmunofluorescencias.

### 8.3.5. La xantona V inhibe el aumento de TNF- $\alpha$ , inducido por LPS.

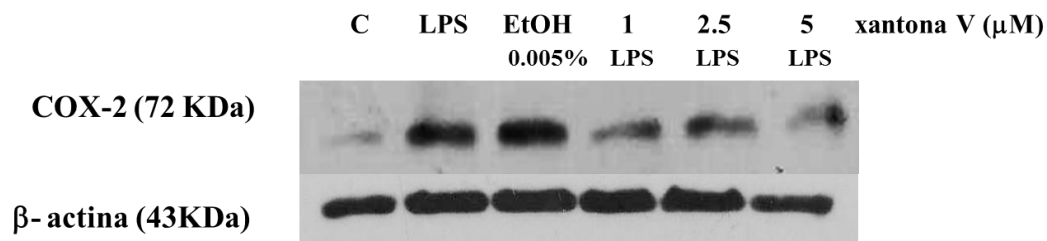
En las gráficas que corresponden a la expresión de TNF- $\alpha$  (marca roja) de las imágenes de inmunofluorescencias obtenidas, se observa un incremento de la expresión TNF- $\alpha$  (Figura 8) en los astrocitos sometidos a tratamiento con LPS. Así mismo, el EtOH no inhibe de manera significativa la expresión de TNF- $\alpha$  (4.3 %). Sin embargo, la xantona V a concentraciones de 1 (61 %) y 2.5 (79 %) inhibió la expresión de TNF- $\alpha$ , de forma dependiente de la concentración.



**Figura 8.** La xantona V inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por el LPS. En las inmunofluorescencias se observa que el LPS induce el aumento de la expresión de TNF $\alpha$  (marca roja) con respecto a los controles en los astrocitos corticales, el EtOH inhibe su expresión en un 10 %, y la xantona V la inhibe de manera dosis-dependiente. La marca azul muestra los núcleos celulares, teñidos con DAPI. ### Diferencia significativa del grupo control; +++ diferencia significativa del grupo LPS ( $p \leq 0.05$ ).

### 8.3.6. El incremento de la cicloxigenasa-2 (COX-2) inducido por el LPS es inhibido por la xantona V.

En células sin estimular, la expresión de COX-2 es baja como se muestra en la Figura 9, después del tratamiento con LPS durante 48 h la expresión de esta proteína aumentó más de 2 veces, el tratamiento con xantona V inhibió la expresión de COX-2 inducida por LPS y el EtOH no produjo cambio significativo con respecto al estímulo. Este resultado preliminar sugiere que la xantona V puede inhibir la expresión COX-2 de forma independiente al EtOH.



**Figura 9.** La xantona V inhibe la expresión de COX-2 inducida por el LPS. A) se observa que el LPS induce el incremento de la expresión de COX-2 en astrocitos y que la xantona V inhibe su efecto. B) Densitometría de los resultados del blot.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Estandarización del modelo de inflamación.

La toxicidad inducida por el LPS en células gliales *in vitro* es un modelo de inflamación celular utilizada comúnmente para valorar un amplio espectro de procesos patofisiológicos que tienen lugar durante los episodios neurodegenerativos<sup>82,83</sup>, el cual involucra la activación inflamatoria y la producción de ROS, permitiendo estudiar ampliamente el mecanismo de acción de fármacos<sup>84</sup>.

En la primera etapa de este trabajo, se estandarizó un protocolo de inflamación en cultivo de astrocitos corticales de rata con LPS de *Salmonella abortus equi*, esta estandarización fue necesaria puesto que no se ha utilizado esta cepa bacteriana para un modelo de inflamación sobre astrocitos. Los datos obtenidos en esta fase nos indican que los astrocitos acondicionados con 10 % de FBS a 100 y 50 µg/ml de LPS de *Salmonella abortus equi* durante 48 h se reactivan; es decir, que en estas condiciones se observaron cambios en su morfología, aumento en la expresión y translocación nuclear de p65, así como el consecuente incremento en la expresión de TNF-α inducido por la activación del factor de transcripción NF-κB, todos estos factores son comúnmente utilizados como marcadores inflamatorios (Figura 3).

Nuestros datos en conjunto coinciden con estudios previos realizados en condiciones similares en modelos realizados de rata y ratón, donde se demuestra que el LPS induce la activación de factores de transcripción y la expresión de citocinas y quimiocinas<sup>85,43,45</sup>. Por lo tanto, las condiciones experimentales estandarizadas en este trabajo se consideraron óptimas para ser usadas como modelo de inflamación *in vitro* en los astrocitos. En consecuencia, este modelo permitió evaluar y cuantificar mediante diferentes técnicas de biología celular, los marcadores inflamatorios que fueron modulados por la xantona V.

Este protocolo, puede ser empleado en otros estudios que requieran un modelo de inflamación celular.



## **9.2. La xantona V protege a los astrocitos de la inflamación inducida por LPS.**

### **9.2.1. La astrogliosis inducida por LPS es disminuída por la xantona V.**

La inflamación cerebral está implicada de forma crónica en el envejecimiento, traumatismo, lesión e infección, ha sido estudiada desde hace varios años cómo factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas<sup>86,87</sup>. Se ha demostrado que la acumulación de ROS participa en la activación inflamatoria mediada por células gliales, principalmente microglía y astrocitos, promoviendo los mecanismos moleculares involucrados en la neuroinflamación<sup>88</sup>.

Actualmente existen numerosos estudios sobre moléculas neuroprotectoras, muchas de ellas provienen del metabolismo secundario de plantas cómo es el grupo de los polifenoles<sup>46</sup>. Se asume generalmente que los beneficios de los polifenoles para la salud están vinculados a su capacidad antioxidante y a su capacidad de unirse químicamente y así neutralizar directamente especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno<sup>89,90</sup>.

Las xantonas, son metabolitos secundarios de plantas que pertenecen a la familia de los polifenoles, su núcleo molecular es una 9-xantenona o dibenzo- $\gamma$ -pirona y la actividad biológica depende de los sustituyentes específicos y sus posiciones a la estructura básica en el sistema de anillo de cada molécula<sup>65,76</sup>. En estudios previos demostramos que la xantona V, en homogenados del tejido cerebral, posee actividad antioxidante y es capaz de unirse químicamente a radicales  $O_2^{\bullet-}$ ,  $ONOO^-$  y  $OH^{\bullet}$  y neutralizarlas directamente<sup>76</sup>. Se sabe que estas especies reactivas están involucradas en el proceso de inflamación derivado de las reacciones inmunológicas producidas por diferentes estímulos. La relación ROS/inflamación se ha estudiado ampliamente, y en general es aceptado que moléculas capaces de modular el sistema antioxidante son potencialmente anti-inflamatorias<sup>91</sup>.

En estudios recientes se ha sugerido que los polifenoles pueden ejercer efectos neuroprotectores mediante la inactivación de la glía. Los diferentes mecanismos moleculares en los que participan los polifenoles sobre las propiedades anti-inflamatorias reportados en la literatura involucran: (1) la disminución de la expresión de la proteína GFAP, (2) la inhibición de la activación de los factores de transcripción pro-inflamatorias como NF- $\kappa$ B que influye en varias vías de señalización, como MAPK, en diferentes tipos celulares del SNC<sup>71</sup> (3) la inhibición de

la liberación de citocinas como: TNF- $\alpha$  de la glía reactiva, (4) el impedimento de la inducción de iNOS y de la producción de NO posterior en respuesta a la glía reactiva y (5) la capacidad para inactivar la NADPH oxidasa y la consecutiva generación de ROS<sup>48,71</sup>.

El efecto característico de la neuroinflamación es la activación de la glía acompañada de la producción de citocinas y mediadores inflamatorios que pueden llegar a desencadenar el daño neuronal. La activación de la glía se estudia principalmente con la evaluación en los cambios de expresión de la proteína de filamento intermediario del citoesqueleto GFAP, el cual es utilizado como marcador molecular distintivo de los astrocitos maduros, la alteración de la expresión de esta proteína se considera como parte del espectro de cambios que acompañan a los procesos de la astrogliosis o astrocitos reactivos<sup>24,86</sup>, esto es, la expresión de GFAP es directamente proporcional con la astrogliosis. Los resultados mostraron que los astrocitos expuestos con LPS a 50  $\mu\text{g/ml}$  fueron capaces de aumentar los niveles de expresión de GFAP con respecto a la basal, como se observa en la figura 5, sin embargo, cuando las células fueron pre-tratadas 1 h con EtOH 0.005%, y con 2.5  $\mu\text{M}$  de la xantona V, expuestas a LPS en co-tratamiento durante 48 h, disminuyó la expresión de GFAP inducida por LPS en los astrocitos, esto indica que el etanol a bajas concentraciones parece tener un efecto protector al inhibir la astrogliosis.

En los últimos años se han estudiado los efectos benéficos que el etanol tiene a bajas concentraciones en relación a los efectos dañinos que presenta a altas concentraciones<sup>80,92</sup>, la actividad que el EtOH posee sobre la astrogliosis a bajas concentraciones no ha sido reportado. La presencia de la xantona V disuelta en el EtOH hace más prominente la disminución de la expresión de GFAP en las células tratadas con LPS, apuntando un efecto sinérgico de mayor protección. La inhibición de la astrogliosis tanto del EtOH como de la xantona V sugiere que ambos compuestos están modulando varias vías de inflamación involucradas en la reactivación de los astrocitos.

### **9.3. Vías de señalización involucradas en el efecto anti-inflamatorio de la xantona V.**

#### **9.3.1. La xantona V inhibe la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LPS.**

El estímulo inflamatorio con LPS puede activar diferentes vías de señalización molecular, una de las vías de protección más estudiada y de gran interés es la de NF- $\kappa$ B<sup>93</sup>. NF- $\kappa$ B es un sensor de estrés oxidativo, y por tanto, es sensible a la regulación antioxidante. Los resultados de este trabajo muestran un posible efecto sinérgico en la inhibición de la expresión de p65 del EtOH y xantona V. Con respecto al EtOH, no encontramos en la literatura reportes que muestren actividad antioxidante o efecto inhibitor directamente de p65 en astrocitos a la concentración de 0.005% que equivale a 0.82 mM; Davis y Syapin reportaron el efecto del etanol sobre la astrogía usando concentraciones en el rango de 50 a 200 mM y observaron que a concentraciones altas, es capaz de aumentar la expresión y actividad de p65 causando una reacción inflamatoria, esto sugiere que el etanol tiene un efecto bifásico<sup>94</sup>.

Las referencias sobre los polifenoles son más amplias, en diferentes estudios se ha sugerido que los efectos anti-inflamatorios de los polifenoles son resultado de la inhibición de la activación NF- $\kappa$ B. A pesar de la gran cantidad de estudios relacionados con la protección que tienen los polifenoles sobre el SNC, los reportes que involucran la actividad anti-inflamatoria inhibiendo la activación de este factor de transcripción inducida por diversos estímulos en células de la glía son escasos comparados con los estudios realizados en diferentes tipos celulares *in vitro* o *in vivo*. Como puede observarse en la tabla 16, las concentraciones efectivas tanto en microglía y astrogía están en rangos diversos, desde 3.7  $\mu$ M hasta 500 mM; por lo que las concentraciones empleadas en este trabajo de 1-5  $\mu$ M de la xantona V inhiben p65 de NF- $\kappa$ B, lo cual la hace una molécula prometedora para ser estudiada como posible agente terapéutico o profiláctico en enfermedades relacionadas con inflamación por la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B.

**Tabla 16.** Polifenoles que participan en la inhibición de moléculas involucradas en la cascada de inflamación vía NF- $\kappa$ B con diferentes estímulos y en diferentes células de la glía.

<b>Polifenol</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Concentración</b>	<b>Referencia</b>
<b>Quercetina</b>	Microglía	50 $\mu$ M	95
<b>Catequina</b>	Microglía	0.13-2 mM	96
<b>Wogonina</b>	Glioma C6	50 $\mu$ M	97
<b>Baicaleína</b>	Microglía	10 $\mu$ M	98
<b>Genisteína</b>	Astrocitos	50 mM	99
<b>Catalpol</b>	Astrocitos	500 mM	45
<b>Resveratrol</b>	Astrocitos	50 mM	100
<b>Curcumina</b>	Microglía Oligodendrocitos	3.7 $\mu$ M	101

### **9.3.2. La expresión de TNF $\alpha$ y COX-2 inducida por LPS es inhibida por la xantona V, además con la participación del EtOH disminuye la de p65 e iNOS.**

Se ha estudiado el efecto que algunas xantonas y otros polifenoles tienen sobre la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ , y las enzimas iNOS y COX-2; por ejemplo, en estudios realizados con la xantona mangiferina (10  $\mu$ M) demuestran que inhibe la expresión de p65, TNF- $\alpha$  y de iNOS inducido por LPS en macrófagos<sup>102</sup>, además, se demostró una disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  y COX-2 inducidas por LPS en microglía<sup>103</sup>. También, en la investigación de Boonnak y cols., 2014, demostraron que de las xantonas tetra-oxigenadas aisladas de las raíces de *Cratoxylum formosum ssp pruniflorum*, la xantona 7 presentó efecto inhibitorio de los niveles de mRNA de iNOS y COX-2<sup>104</sup> de manera dosis-dependiente (3.9-8.0  $\mu$ M) en macrófagos de la línea RAW264.7. También, se ha reportado que los polifenoles antioxidantes presentes en el arándano reducen la inflamación al inhibir la síntesis de NO, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en microglía<sup>105</sup>, y la naringerina reduce el IFN inducido por LPS en microglía y astrocitos<sup>96</sup>. Se observó que la epicatequina y la catequina (10-300 nM) inhiben la liberación de TNF- $\alpha$ , pero no la producción

de NO en los cultivos primarios de astrocitos y microglía<sup>96</sup>. La quercetina, un flavonol antioxidante comúnmente consumido en el té verde, atenúa la producción de NO y de la expresión de iNOS en la microglía y previene la producción de citocinas pro-inflamatorias, evitando de este modo la lesión neuronal<sup>95</sup>, y la isoflavona genisteína reduce la expresión de COX-2 e iNOS (50 mM) en astrocitos a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B<sup>99</sup>. Todos estos estudios demuestran que los polifenoles, como lo es la xantona V, a diferentes concentraciones modulan el proceso de inflamación *in vitro* en el CNS<sup>96</sup>. Como en los estudios mencionados, en este trabajo mostramos que la xantona V disminuye la expresión de iNOS en sinergia con el EtOH, de TNF $\alpha$  de forma independiente al EtOH, y COX-2, también de forma independiente al vehículo, éste último resultado tiene que ser corroborado ya que se trata de un dato preliminar. Los resultados de este estudio muestran que la inhibición de iNOS por la xantona V posiblemente en sinergia con el EtOH fue más potente que la obtenida para p65 esto, aunado al efecto inhibitorio independiente al EtOH de la xantona V sobre TNF- $\alpha$  y COX-2, sugieren la participación de otro mecanismo molecular independiente de NF- $\kappa$ B.

En la respuesta al estímulo inflamatorio inducido por LPS se activan diferentes vías de señalización que involucra otros factores de transcripción que se unen al DNA y transcriben genes para iNOS, TNF $\alpha$  y COX-2. Una de estas vías es de las MAPK, este mecanismo molecular tiene un papel importante en la muerte neuronal inducida por los astrocitos reactivos. Las MAPK, que incluyen ERK1/2, JNK y la cinasa p38, son importantes en la transducción de señales extracelulares en la respuesta celular. Cuando estas moléculas se activan, fosforilan a la proteína diana citosólica y nuclear resultantes en la activación de factores de transcripción y finalmente en la regulación de la expresión génica. Se ha reportado que tanto p38 y JNK regulan la muerte neuronal inducida por la glía activada.

Ha sido demostrado que la señalización de las MAPK regula la activación de la vía de iNOS y subsecuentemente la producción de NO y la liberación de citocinas<sup>48</sup> Por ejemplo, en células gliales estimuladas con LPS la expresión del INF- $\gamma$ , iNOS y TNF- $\alpha$  está regulada por las cascadas de señalización de las vías de ERK1/2 y de MAPK<sup>48,98</sup>. Por otra parte, JNK1 una isoforma específica de JNK, modula la inducción de iNOS e IFN- $\gamma$  en astrocitos activados con LPS, mientras que la señalización de ERK también funciona como mediador de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducida por la expresión de iNOS en astrocitos. Estos estudios sugieren que las MAPK juegan un papel fundamental tanto en la producción de citocinas y moléculas pro-inflamatorias

inducidas por LPS<sup>48,98</sup>. Se ha descrito que esta vía es modulada por diferentes polifenoles en diversos tipos celulares del SNC como la curcumina, el resveratrol, el magnolol, la baicaleína y la morina (ver tabla 17).

**Tabla 17.** Estudios realizados con polifenoles que regulan proteínas involucradas en la vía de las MAPK, en diferentes tipos celulares.

<b>Polifenol</b>	<b>Actividad</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Concentración</b>	<b>Referencia</b>
<b>Magnolol</b>	Inhibe la fosforilación de ERK, JNK, pero no p38	RAW 264.7	5 y 10 $\mu$ M	106
<b>Resveratrol</b>	Inhibe fosforilación de p38 y AP-1	Microglía	5-50 $\mu$ M	43
<b>Curcumina</b>	Inhibe ERK, p38, JNK	BV2	8 $\mu$ M	
<b>Resveratrol</b>	Inhibe JNK	Astrocitos	5-50 $\mu$ M	43
<b>Morina</b>	Inhibe p38 y ERK 1/2	YPEN-1	5 $\mu$ M	107

Para la continuación de este estudio es importante evaluar el efecto que la xantona V y el EtOH tienen sobre la vía de las MAPK; diseñar experimentos *in vitro* e *in vivo* para determinar hasta donde el efecto antioxidante de la xantona V está participando en su actividad anti-inflamatoria, o para conocer si tienen blancos moleculares directos buscando un solvente inerte al mecanismo de inflamación, con el objetivo de dilucidar los mecanismos involucrados en los efectos anti-inflamatorios de ambos compuestos: xantona V y EtOH.

## CONCLUSIONES

- a) El acondicionamiento con DMEM + 1 % SBF induce astrogliosis a 24, 48 y 72 h
- b) Las condiciones del modelo de inflamación *in vitro* en astrocitos corticales de rata neonata con LPS de *Salmonella abortus equi* son 50 µg/ml durante 48h, condiciones en las que induce el aumento de la expresión de GFAP, p65, NF-κB, iNOS, TNF-α, y COX-2.
- c) La xantona V mantiene la viabilidad de los astrocitos corticales de rata en el rango de concentraciones de 1-5 µM.
- d) La xantona V en posible sinergia con el EtOH a 0.005% protege a los astrocitos primarios del incremento en la expresión de GFAP, p65, e iNOS inducidas por LPS.
- e) La xantona V protege a los astrocitos primarios del incremento en la expresión de TNF-α, y COX-2, inducidas por LPS.

## 10. REFERENCIAS

1. Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Massarini A. *Biología*. 7a ed. Buenos Aires: Medica panamericana.; 2013:1160.
2. Nieuwenhuys. *El sistema nervioso central humano/ The human central nervous system, Volume 1*. Ed. Médica Panamericana; 2009:336. Available at: <http://books.google.com/books?id=dCVILqEel6MC&pgis=1>. Accessed September 11, 2013.
3. Alcaraz VM. *Estructura y función del sistema nervioso. recepción sensorial y estados del organismo*. 1a ed. México: Universidad de Guadalajara; 2000:263.
4. Braillon MG. *El sistema nervioso central*. Ediciones Morata; 1992:76. Available at: <http://books.google.com/books?id=PKZfI9ojrIC&pgis=1>. Accessed December 9, 2013.
5. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. *Neurociencia*. 3a ed. Mexico: Editorial Médica Panamericana; 2010.
6. Perea G, Araque A. Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas. *Rev Neurol*. 2003;36(2):137–144.
7. Diaz B. M, Diaz G. *Sistema Nervioso Central: Estructura y función parte II.*; 2002.
8. Tortora GJ, Grabowski SR. *Anatomía y Fisiología*. 9a ed. Ciudad de México: Oxford University Press Harla; 2002:1175.
9. Smith K. Settling the great glia debate. *Nature*. 2010;468:160–162.
10. Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*. 2010;63(1-2):2–10. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.12.001.
11. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human Blood-Brain Barrier. *Glia*. 2001;155(36):145–155. doi:10.1002/glia.1104.
12. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev*. 1999;30:77–105.
13. Pérez Capote K. Respuesta de las células gliales al daño neuronal in vitro. 2006:56.
14. Privat A, Rataboul P. Fibrous and protoplasmic astrocytes. In: Federoff S, Vernadakis V, eds. *Astrocytes: Development, Morphology, and Regional Specialization of Astrocytes*. Orlando: Academic Press; 1986:105–129.



15. Somjen GG. Nervenkit: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*. 1988;1:2–9.
16. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In: *Astrocytes: Methods and protocols*. Vol 814. Springer Science+Business Media; 2012:23–45. doi:10.1007/978-1-61779-452-0.
17. Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM. Estructura y funciones de la macroglía en el sistema nervioso central . Respuesta a procesos degenerativos. *Rev Neurol*. 1998;26(152):600–611.
18. Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
19. Alonso A, Ambrosio E, Calleja M de B, Caminero A, Lecumberri C, Gonzalez J. *Fundamentos biológicos de la conducta.*; 2005.
20. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999;22(5):208–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10322493>.
21. Inagaki N, Fukui H, Wada H. Type-2 astrocytes show intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in response to various neuroactive substances. *Neurosci Lett*. 1991;128:257–260.
22. Seidman KJN, Teng AL, Rosenkopf R, Spilotro P, Weyhenmeyer JA. Isolation, cloning and characterization of a putative type-1 astrocyte cell line. *Brain Res*. 1997;753:18–26.
23. García-Matas S. Alteraciones de los astrocitos en el envejecimiento y en la enfermedad de alzheimer. 2009:238.
24. Nag S. Morphology and properties of astrocytes. In: Nag S, ed. *The Blood-Brain and Other Neural Barriers*. Vol 686. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press; 2011:69–101. doi:10.1007/978-1-60761-938-3.
25. Ahlemeyer B, Kehr K, Richter E, Hirz M, Baumgart-vogt E, Herden C. Phenotype , differentiation , and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J Neurosci Methods*. 2013;212:156–164.
26. Haas C, Neuhuber B, Yamagami T, Rao M, Fischer I. Phenotypic analysis of astrocytes derived from glial restricted precursors and their impact on axon regeneration. *Exp Neurol*. 2012;233(2):717–32. doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.002.
27. Maschio MD, Beltramo R, Stasi AM De, Fellin T. Two-Photon calcium imaging in the intact brain. In: Islam MS, ed. *Calcium Singaling. Advances in Experimental*. Springer Science+Busines; 2012:83–102. doi:10.1007/978-94-007-2888-2.

28. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): Function and molecular description. *Neurologia*. 2013;11. doi:10.1016/j.nrl.2012.12.007.
29. Schummers J, Yu H, Sur M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science (80- )*. 2008;320:1638—43.
30. Blázquez Ortiz C. Cetogénesis en astrocitos: caracterización, regulación y posible papel citoprotector. 2001.
31. Escartin C, Bonvento G. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol*. 2008;38(3):231–41. doi:10.1007/s12035-008-8043-y.
32. Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. *Mol Neurobiol*. 2009;40(1):15–32. doi:10.1007/s12035-009-8066-z.
33. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*. 2010;49(2):97–107. doi:10.1016/j.plipres.2009.06.002.
34. Bermejo A, Duarte J. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. *Ars Pharm*. 2003;44(2):121–139.
35. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(9):1121–32. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.006.
36. Del Pozo JL. Primers on molecular pathways: lipopolysaccharide signaling - potential role in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol*. 2010;10(2-3):114–8. doi:10.1159/000299987.
37. Bian Y, Zhao X, Li M, Zeng S, Zhao B. Various roles of astrocytes during recovery from repeated exposure to different doses of lipopolysaccharide. *Behav Brain Res*. 2013;253:253–61. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.028.
38. Johann S, Kampmann E, Denecke B, et al. Expression of enzymes involved in the prostanoid metabolism by cortical astrocytes after LPS-induced inflammation. *J Mol Neurosci*. 2008;34(2):177–85. doi:10.1007/s12031-007-9028-4.
39. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. TNF $\alpha$  induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*. 1992;583(1-2):296–299. doi:10.1016/S0006-8993(10)80037-X.
40. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation*. 2010;7:30. doi:10.1186/1742-2094-7-30.

41. Sheng W, Zong Y, Mohammad A, et al. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA<sub>2</sub>-IIA expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):121. doi:10.1186/1742-2094-8-121.
42. Liu M-H, Lin Y-S, Sheu S-Y, Sun J-S. Anti-inflammatory effects of daidzein on primary astroglial cell culture. *Nutr Neurosci*. 2009;12(3):123–34. doi:10.1179/147683009X423274.
43. Lu X, Ma L, Ruan L, et al. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2010;7:46. doi:10.1186/1742-2094-7-46.
44. Lee Y-J, Choi D-Y, Choi IS, et al. *Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models.*; 2012:35. doi:10.1186/1742-2094-9-35.
45. Bi J, Jiang B, Zorn A, Zhao R-G, Liu P, An L-J. Catalpol inhibits LPS plus IFN- $\gamma$ -induced inflammatory response in astrocytes primary cultures. *Toxicol Vitr*. 2013;27:543–50. doi:10.1016/j.tiv.2012.09.023.
46. Hernández Ángel M, Prieto González EA. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Cuba Invest Biomed*. 1999;18(1):12–14.
47. Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV, Matute C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium*. 2009;45(4):358–68. doi:10.1016/j.ceca.2008.12.007.
48. Vafeiadou K, Vauzour D, Spencer JPE. Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2007;7(3):211–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22107709>.
49. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*. 2010;15(11):7792–814. doi:10.3390/molecules15117792.
50. Solís IM. *Manual de fitoterapia*. Elsevier España; 2007:506. Available at: <http://books.google.com/books?id=SgZjLFGBAAC&pgis=1>. Accessed January 7, 2014.
51. Hernández AG. *Tratado de nutrición / Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos / Composition and Nutritional Quality of Foods*. Ed. Médica Panamericana; 2010:786. Available at: <http://books.google.com/books?id=hcwBJ0FNvqYC&pgis=1>. Accessed January 7, 2014.

52. González R, Ballester I, López-Posadas R, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit reviews food Sci Nutr.* 2011;51(4):331–62. doi:10.1080/10408390903584094.
53. Farooqui AA. Beneficial Effects of Curcumin on Neurological. In: *Phytochemicals, Signal Transduction, and Neurological Disorders.* New York, NY; 2012:151–197. doi:10.1007/978-1-4614-3804-5.
54. Adler V, Yin Z, Fuchs S, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 1999;18:1321–1334.
55. Gutierrez-Orozco F, Failla ML. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: a critical review of the current evidence. *Nutrients.* 2013;5(8):3163–83. doi:10.3390/nu5083163.
56. Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica.* 2da ed. Venezuela: CDCH UCV; 2002. Available at: <http://books.google.com/books?id=hPkjgPwXD-QC&pgis=1>. Accessed January 23, 2014.
57. Estrada-Muñiz E. Estudio químico y actividad biológica de las xantonas aisladas del duramen de *Calophyllum brasiliense*. 1998.
58. Peres V, Nagem TJ, de Oliveira FF. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry.* 2000;55(7):683–710. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11190384>.
59. Bumrungpert A, Kalpravidh RW, Chuang CC, et al. Xanthenes from mangosteen inhibit inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *J Nutr.* 2010;140:842–847.
60. Liu SH, Lee LT, Hu NY, et al. Effects of  $\alpha$ -mangostin on the expression of anti-inflammatory genes in U937 cells. *Chin Med.* 2012;7(19).
61. Bumrungpert A, Kalpravidh RW, Chitchumroonchokchai C, et al. Xanthenes from mangosteen prevent lipopolysaccharide-mediated inflammation and insulin resistance in primary cultures of human adipocytes. *J Nutr.* 2009;139:1185–1191.
62. Tewtrakul S, Wattanapiromsakul C, Mahabusarakam W. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol.* 2009;121:379–382.
63. Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:688–693.
64. Vidari G, VitaFinzi P. The Gentianaceae: botany, phytochemistry and biological activity. *La Granja* 2010, 2(1):3-14. *La granja.* 2010;2(1):3–14.

65. Torres Sosa CA. Evaluación in vitro de xantonas y sesquiterpenoides de origen vegetal como agente hipoglucemicos en aorta de rata. 2001:57.
66. Yimdjo MC, Azebaze AG, Nkengfack AE, Meyer a M, Bodo B, Fomum ZT. Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. 2004;65:2789–95. doi:10.1016/j.phytochem.2004.08.024.
67. Cambess C. *Calophyllum brasiliense* Cambess. *Flora Bras Merid*. 1825;1(321):100–102.
68. Arellano Castillo I. Efecto de los nutriente sobre el crecimiento de plántulas de *Calophyllum brasiliense* y la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés farmacológico. 2009:0–99.
69. Ortega Escalona F, Castillo Morales I, Carmona Valdovinos T. *Anatomía de la madera de 26 especies de la selva Lacandona, Chiapas*. (UAM, ed.). México: Instituto de Ecología; 1991:200.
70. Martínez M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México: Fondo de Cultura Económica; 1994:88.
71. Vauzour D, Kerr J, Czank C. Plant polyphenols as dietary modulators of brain Functions. In: *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier Inc.; 2014:357–370. doi:10.1016/B978-0-12-398456-2.00027-X.
72. Kim J, Lee KW, Lee HJ. *Polyphenols Suppress and Modulate Inflammation : Possible Roles in Health and Disease*. Elsevier Inc.; 2014:393–408. doi:10.1016/B978-0-12-398456-2.00029-3.
73. Reyes-Chilpa R, Jimenez-Estrada M, Estrada-Muñiz E. Antifungal xanthones from *Calophyllum brasiliense* heartwood. *J Chem Ecol*. 1997;23(7):1901–1911.
74. Mesía-Vela S, Sánchez R, Estrada-Muñiz E, et al. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: Novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*. 2001;8(6):481 – 488.
75. Reyes-Chilpa R, Alvarez-Solano D, Estrada-Muñiz E. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthones isolated from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;105(1-2):167–172.
76. Blanco-Ayala T, Lugo-Huitrón R, Serrano-López EM, et al. Antioxidant properties of xanthones from *Calophyllum brasiliense*: prevention of oxidative damage induced by FeSO<sub>4</sub>. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:262. doi:10.1186/1472-6882-13-262.
77. McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980;85:890–902.

78. Torres-Ramos MA, M. R. S, A. H. P, T-S C. Expresion y distribucion de la subunidad NR1 del receptor para N-metil-D-aspartato (NMDR) en cultivos primarios corticales de rata. *Arch Neurocién.* 2011;16.
79. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>.
80. Oliveira Loureiro S, Heimfarth L, Ortiz de Lima B, et al. Dual action of chronic ethanol treatment on LPS-induced response in C6 glioma cells. *J Neuroimmunol.* 2012;249(1-2):8–15. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.04.004.
81. Serrano-López EM, Gonzalez-Muñiz AY, Trejo-Solís C, et al. Estandarización de paradigmas de activación de celulas gliales en cultivos primarios de rata. *Arch Neurocién.* 2012;17(2):40–44.
82. Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res.* 1999;35:95–100.
83. Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: In vitro and in vivo studies. *Glia.* 2000;32:51–59.
84. Originales T, Works O. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. 2003:121–139.
85. Minogue AM, Barrett JP, Lynch MA. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1  $\beta$  in a JAK2-dependent manner. *J Neuroinflammation.* 2012;9(126):10. doi:10.1186/1742-2094-9-126.
86. Cuenca-lópez MD, Brea D, Segura T, Galindo MF, Antón-martínez D, Agulla J. La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Rev Neurol.* 2010;50(6):349–359.
87. Morales G. I, Farías G. G, Maccioni B. RB. Neuroinflammation as a triggering factor for Alzheimer's disease. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 2010;48(1):49–57.
88. Schipper HM. *Astrocytes in Brain Aging and Neurodegeneration.* (Company RGL, ed.). Estados Unidos de América: Neuroscience Intelligence Unit; 1998:256.
89. Pannala A, Rice-Evans C, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232(1):164–8.

90. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006;97(6):1634–58. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.
91. Block ML, Zecca L, Hong J-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):57–69. doi:10.1038/nrn2038.
92. Lipnik-štangelj M. Ethanol Toxicity in the Brain : Alteration of Astroglial Cell Function. In: Gallelli L, ed. *Pharmacology*. INTECH; 2012:607–624.
93. Camandola S, Mattson M. NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(2):123–32.
94. Davis RL, Syapin PJ. Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells. *Neurosci Lett*. 2004;371(2-3):128–32.
95. Kao T, Ou Y, Raung S, Lai C, Liao S, Chen C. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin- cytokine-stimulated microglia. *Life Sci*. 2010;86:315–21.
96. Vafeiadou K, Vauzour D, Lee H, Rodriguez-Mateos A, Williams R, Spencer J. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophys*. 2009;484(1):100–9.
97. Kim H, Kim Y, Kim S, Suk K. The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neurosci Lett*. 2001;309(1):67–71.
98. Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med*. 2012;33(1):83–97. doi:10.1016/j.mam.2011.10.016.
99. H. L, J.-X. S, D.-M. Z, et al. Inhibition of hemolysate-induced iNOS and COX-2 expression by genistein through suppression of NF- $\kappa$ B activation in primary astrocytes. *J Neurol Sci*. 2009;278:91–95.
100. Quincozes-Santos A, Gottfried C. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:72–8. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05857.x.
101. Bisht K, Wagner K-H, Bulmer AC. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*. 2010;278(1):88–100. doi:10.1016/j.tox.2009.11.008.
102. Leiro J, Arranz JA, Yáñez M, Ubeira FM, Sanmartín ML, Orallo F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(6):763–78. doi:10.1016/j.intimp.2004.03.002.

103. Bhatia HS, Candelario-Jalil E, de Oliveira ACP, Olajide OA, Martínez-Sánchez G, Fiebich BL. Mangiferin inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in activated rat microglial cells. *Arch Biochem Biophys*. 2008;477(2):253–8. doi:10.1016/j.abb.2008.06.017.
104. Boonnak N, Chantrapromma S, Tewtrakul S, Sudsai T. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophages by isolated xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. *Arch Pharm Res*. 2014. doi:10.1007/s12272-014-0338-0.
105. Lau F, Bielinski D, Joseph J. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *J Neurosci Res*. 2007;85(5):1010–7.
106. Lai C-S, Lai Y-S, Kuo D-H, Wu C-H, Ho C-T, Pan M-H. Magnolol potently suppressed lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression via downregulating MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Funct Foods*. 2011;3(3):198–206. doi:10.1016/j.jff.2011.04.002.
107. Kim JM, Lee EK, Park G, et al. Morin modulates the oxidative stress-induced NF-kappaB pathway through its anti-oxidant activity. *Free Radic Res*. 2010;44(4):454–61. doi:10.3109/10715761003610737.