



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“EFECTO DE UNA FRACCIÓN DE *MALVA PARVIFLORA* EN UN MODELO MURINO DE NEUROINFLAMACIÓN.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
CRISTINA ELIZABETH RAMÍREZ SERRANO

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Leonor Pérez Martínez
Instituto de Biotecnología - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Enrique Jiménez Ferrer. CIBIS-IMSS
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz. CIBIS-IMSS

Cuernavaca, Mor. Agosto, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Leonor Pérez Martínez

ASESORES:

Dr. Enrique Jiménez Ferrer. CIBIS-IMSS

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz. CIBIS-IMSS

JURADO REVISOR DE TESIS.

Dra. Clarita Olvera Carranza

Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes

Dr. Humberto Lanz Mendoza

Dra. Magdalena Guerra Crespo

Dra. Lidia Riaño Umbarila

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA203416, PAPIIT IN213316 Y PAPIIT IN212316), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 155290) y del Fondo de Investigación en Salud-IMSS (FIS/IMSS/PROT/G11/988).

INDICE.

	Página
RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
1.- INTRODUCCIÓN	4
1.1.- Epidemiología	4
1.2.- Características clínicas	5
1.3.- Características histopatológicas.	5
1.4.- Hipótesis amiloidea e hipótesis colinérgica.	5
1.5.- Factores asociados al desarrollo de la EA	6
1.6.- Inmunidad innata y riesgo a padecer EA	7
1.7.- Anti-inflamatorios no esteroideos y EA	8
1.8.- Modelos de neuroinflamación asociados a EA	8
1.9.- Tratamientos	9
2.- ANTECEDENTES	10
2.1.- Generalidades de <i>Malva parviflora</i>	10
2.2.- Reportes químicos de <i>Malva parviflora</i>	11
2.3.- Reportes farmacológicos de <i>Malva parviflora</i>	11
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4.- HIPOTESIS	13
5.- OBJETIVO	13
5.1.- Objetivos particulares.	14

6.- MATERIALES Y METODOS	15
6.1.- Selección química-biodirigida de la fracción con propiedades anti-inflamatorias de <i>Malva parviflora</i> .	15
6.1.1.- Evaluación de diferentes extractos de <i>Malva parviflora</i> potencial anti-inflamatorio en un modelo de edema auricular inducido con TPA.	15
6.1.2.- Fraccionamiento del extracto de <i>M. parviflora</i> con mayor actividad anti-inflamatoria y elucidación estructural de un compuesto aislado.	15
6.1.3.- Evaluación de diferentes fracciones del MpD con potencial anti-inflamatorio en un modelo de edema auricular inducido con TPA.	16
6.1.4.- Evaluación de dos fracciones y un compuesto aislado con potencial anti-inflamatorio en macrófagos RAW Blue.	16
6.2.- Efecto farmacológico de una fracción y un compuesto con actividad anti-inflamatoria en un modelo murino de neuroinflamación.	17
6.2.1.-Evaluación de aprendizaje y memoria espacial en Laberinto Acuático de Morris (LAM).	17
6.2.2.-Determinación de astrogliosis reactiva por inmunohistoquímica.	18
6.3.-Análisis estadístico	19
7.- RESULTADOS	20

7.1.- Selección química-biodirigida de fracción con propiedades anti-inflamatorias de <i>Malva parviflora</i> .	20
7.1.1.- Evaluación de extractos derivados de <i>M. parviflora</i> en un modelo de edema auricular.	20
7.1.2.-Fraccionamiento de MpD y obtención de compuesto aislado.	21
7.1.3.- Evaluación de fracciones y compuesto aislado de MpD en modelo de edema auricular.	23
7.1.4.- Evaluación de fracciones y compuesto aislado de MpD en macrófagos RAW Blue.	23
7.2.- Efecto farmacológico de MpF10 en un modelo murino de neuroinflamación.	28
7.2.1.- Evaluación de memoria y aprendizaje en Laberinto Acuático de Morris (LAM).	29
7.2.2.- Astrogliosis reactiva en hipocampo.	32
8.- DISCUSIÓN	34
9.- CONCLUSIONES	38
10.- PERSPECTIVAS	39
11.- BIBLIOGRAFÍA CITADA	40

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se manifiesta principalmente a través del deterioro cognitivo y desórdenes conductuales. La etiología de este padecimiento no es bien conocida, sin embargo se sabe que los procesos inflamatorios desarrollados antes o durante el progreso de dicha enfermedad tienen un papel muy importante dentro de la cascada neurodegenerativa presente. Basado en esto, se han planteado posibles nuevas estrategias para su tratamiento a través del uso de agentes anti-inflamatorios, principalmente no esteroideos (AINEs), cuya administración en esquemas específicos ha mostrado una disminución en la incidencia de ésta enfermedad en pacientes asintomáticos, pero también efectos adversos en etapas tardías, por lo que la búsqueda de nuevas moléculas continúa.

En este contexto, las plantas medicinales resultan de gran interés como fuente de metabolitos secundarios con variada actividad farmacológica, entre ella la anti-inflamatoria, que en conjunto pudieran contrarrestar o disminuir procesos patológicos asociados, a la EA. Se ha demostrado que el extracto hidro-alcohólico de *Malva parviflora* (MpHA) posee efecto antioxidante y anti-inflamatorio, además de mejorar el déficit cognitivo en ratones 5XFAD con dieta hipercalórica. Sin embargo, dada la riqueza de compuestos presentes en este extracto, su caracterización química y farmacológica integral resulta sumamente compleja, por lo que en este proyecto se generó y seleccionó según su actividad anti-inflamatoria, una fracción químicamente menos compleja que el MpHA, la cual se evaluó en un modelo murino de neuroinflamación, mostrando resultados que parecen recapitular el efecto farmacológico de MpHA.

Lista de abreviaturas utilizadas.

AINEs.- Anti-inflamatorios no esteroideos.

β A.- Péptido β amiloide.

BHE.- Barrera hematoencefálica.

ChAT.- Colin acetil transferasa.

CIBIS.- Centro de investigaciones Biomédicas del Sur.

DMSO.- Dimetilsulfóxido.

EA.- Enfermedad de Alzheimer.

FAD. EA familiar (por sus siglas en inglés).

GFAP.- Proteína acídica fibrilar glial (por sus siglas en inglés).

ICV.- Intracerebroventricular

Indo.- Indometacina.

INF-y.- interferón gamma.

LAM.- Laberinto Acuático de Morris.

LPS.- Lipopolisacárido (en bacterias gram negativas).

MpA.- Extracto acetónico de *Malva parviflora*.

MpD.- Extracto de diclorometano de *Malva parviflora*.

MpFDau.- Compuesto aislado (Daucosterol) de *Malva parviflora*.

MpHA.- Extracto hidro-alcohólico de *Malva parviflora*.

MpM.- Extracto metanólico de *Malva parviflora*.

MpF5.- Fracción 5 de *Malva parviflora*.

MpF6c.- Fracción 6c de *Malva parviflora*.

MpF6s.- Fracción 6s de *Malva parviflora*.

MpF7.- Fracción 7 de *Malva parviflora*.

MpF10.- Fracción 10 de *Malva parviflora*.

MpF12.- Fracción 12 de *Malva parviflora*.

PS.- Placas seniles.

ON.- Óxido nítrico.

ONFs.- Ovillos neurofibrilares.

PPA.- Proteína precursora amiloide.

RMN.- Resonancia Magnética Nuclear.

SNC.- Sistema Nervioso Central.

TPA.- 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol.

T4.- Tripchlorolide.

TNF- α .- Factor de Necrosis Tumoral- alfa.

Veh.- Vehículo.

v.o.- Vía oral.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Epidemiología

La demencia es un síndrome caracterizado por la alteración de múltiples funciones cerebrales, incluyendo la memoria, el razonamiento, la orientación, la comprensión, el aprendizaje, el lenguaje y el juicio; y comúnmente acompañado por el deterioro del control emocional, el comportamiento social y la motivación. Este síndrome tiene una alta prevalencia e incidencia, en 2015 se estimaba que 46.8 millones de personas en el mundo la padecían y que habría 9.9 millones de casos nuevos durante el mismo año, lo que significa uno cada 3.2 segundos. Además se estima que para el 2030 se alcanzarán los 74.7 millones y para el 2050 los 131.5 millones (World Alzheimer Report, 2015).

Por otro lado, se sabe que este padecimiento se encuentra directamente asociado al envejecimiento, duplicando su incidencia cada 5.9 años después de los 60-64 (World Alzheimer Report, 2015). En este mismo contexto, la incidencia de este tipo de padecimientos ha tendido a aumentar debido a la inversión de la pirámide poblacional, fenómeno en el que la población de adultos mayores aumenta gracias a las nuevas tecnologías médicas que permiten una mayor esperanza de vida.

El tipo más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer (EA) con una proporción a nivel global, que va del 50% al 75% del total (Santana, 2015). Un ejemplo de su elevada prevalencia es Estados Unidos, donde en 2014 se reportó que 5.2 millones de habitantes padecían esta enfermedad y se estimó que para el 2050 su prevalencia será de 13.8 millones (Alzheimer's Association, 2014). Por otro lado, en el caso de México, para el 2014 se estimó que existían alrededor de 86 mil casos y se calcula que para el 2050 habrá 3.5 millones de personas afectadas (Gutiérrez-Robledo, 2015).

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

1.2.- Características clínicas.

Además del declive cognitivo característico del padecimiento, en la EA puede observarse un cuadro clínico que incluye usualmente afasia, problemas visuales, simultanagnosia y ataxia ocular; además de diversas alteraciones en el comportamiento y algunos síntomas neuropsiquiátricos, como ansiedad, depresión y pérdida de la capacidad de aprendizaje y la memoria (Cummings, 2000; Duthey, 2013).

1.3.- Características histopatológicas.

Si bien es cierto que no hay una clara línea sobre la etiología de esta enfermedad, sí se han identificado ya elementos determinantes para el desarrollo de la misma, como la muerte neuronal que inicialmente se presenta en la región del hipocampo y más tarde se extiende al resto del cerebro. Por otro lado, también sobresalen dos alteraciones histopatológicas cuya aparición se da especialmente en la corteza y el hipocampo, estos son los ovillos neurofibrilares (ONFs) y las placas seniles (PS) (Cordena s-Aguayo, 2014).

Las PS son agregados extracelulares compuestos principalmente del péptido β amiloide (β A). Este deriva del procesamiento de la proteína precursora amiloide (PPA) por las enzimas β y γ -secretasas, las cuales al cortar en sitios determinados llevan a su producción. (Armstrong, 2009). Además de esta vía de procesamiento denominada “amiloidogénica”, también existe la fisiológica o “no amiloidogénica”, en la cual no participa la enzima β -secretasa, sino la α -secretasa, no produciéndose el péptido β A.

Por otro lado, los ONFs, son lesiones intracelulares que se desarrollan en las neuronas piramidales de la corteza y en neuronas con axones muy largos de los núcleos sub-corticales, éstas consisten principalmente de filamentos aberrantes de la proteína *tau* hiperfosforilada (Koechling, 2010), la cual en condiciones fisiológicas normales tiene un papel estabilizador de los microtúbulos en las neuronas.

1.4.- Hipótesis amiloidea e hipótesis colinérgica.

Existen varias hipótesis sobre la etiología de la EA, una de ellas es la “hipótesis amiloidea”. Esta explica la aparición de las principales características de la enfermedad como resultado de una producción exacerbada del péptido β A. Donde la sobreproducción estaría siendo causada por una

disrupción en la homeostasis que regula el procesamiento de la PPA, favoreciendo su procesamiento amiloidogénico. Lo anterior promovido por factores genéticos, o relacionados a la edad y al ambiente (Harris, 2012).

Otra propuesta para explicar el origen de los síntomas presentes en la EA es la “hipótesis colinérgica”, la cual sugiere que una disfunción en la vía colinérgica dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) contribuye substancialmente al declive observado en los pacientes que la padecen (Terry, 2003). Esta es la base de la mayoría de los tratamientos prescritos al momento, de los que se hablará más adelante. Sin embargo, existen algunas evidencias que desafían esta hipótesis, por ejemplo, DeKosky y colaboradores fueron capaces de encontrar únicamente la disminución de la enzima colina acetil transferasa (ChAT -encargada de la formación de acetilcolina-) en corteza de pacientes con EA en etapas terminales, no así en EA leve (DeKosky, 2002).

1.5.- Factores asociados al desarrollo de la EA

Como ya se comentó de manera muy breve, existen diferentes factores que pueden favorecer el procesamiento amiloidogénico de la PPA; estos pueden estar relacionados a la edad, al ambiente o ser genéticos.

Dentro de los factores genéticos se encuentran principalmente las mutaciones en los genes APP, PSEN1 y PSEN2, las cuales conducen de manera inevitable al padecimiento de la EA “familiar” (FAD por sus siglas en inglés). Para el caso del gen APP se han reportado alrededor de 30 mutaciones, varias de ellas, cerca del sitio de corte de la γ -secretasa, y dos que promueven un incremento en los niveles de la proteína silvestre (wild- type), Por otro lado, para PSEN1 se sabe de alrededor de 180 mutaciones y para PSEN2 cerca de 14 (Armstrong, 2013).

La EA familiar (FAD) es poco común, constituyendo solo un 5% o menos de los casos totales (Bertram, 2012; Armstrong, 2013), mostrándonos la importancia de otros factores de riesgo que promueven el desarrollo de la enfermedad en el 95% restante de los casos. Algunos de estos factores son la edad, traumatismos cerebrales, algunos factores sociales, infecciones sistémicas, obesidad, actividad física reducida, y enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión (Alzheimer’s association, 2014; Lim, 2013; Matrone, 2015; Dosunmu, 2007), donde la mayoría o todos, involucran la activación del sistema inmune innato, propiciando un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante, que se ha sugerido, ejercen efectos dañinos en el SNC que perduran mucho más tiempo que el estímulo original.

1.6.- Inmunidad innata y riesgo a padecer EA.

La neuroinflamación es una respuesta inmune innata en sistema nervioso que pretende inactivar o eliminar un daño potencial. Históricamente, ésta se había visto ligada a la EA únicamente como una respuesta a las PS, sin embargo, recientemente se ha asociado desde una perspectiva diferente, donde juega un papel muy importante durante el proceso de iniciación de la cascada neurodegenerativa.

Al considerar entonces los factores de riesgo ya mencionados, se ha propuesto que el proceso inflamatorio podría originarse inicialmente a nivel periférico y posteriormente llegar al SNC. Esto sería posible gracias a un daño en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual no sería capaz de impedir el paso de moléculas pro-inflamatorias (Cunninham, 2013).

Lo anterior es apoyado por evidencias experimentales donde se ha observado que una inflamación sistémica derivada de diferentes estímulos como son infecciones de diversos tipos, la administración de lipopolisacárido de bacterias gram negativas (LPS), una dieta alta en grasa o padecimientos como diabetes e hipertensión, inducen o exacerban el desarrollo de ciertas características de la enfermedad, como pérdida de proteínas sinápticas, deposición de agregados amiloides, mayor actividad de la β -secretasa y problemas cognitivos (Lim, 2015; Lykhus, 2015; Lee, 2008; Weberpals, 2009; Elysse, 2014; Carnevale, 2012; Freude, 2009; Sheng, 2003; Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

En este contexto, moléculas pro-inflamatorias y/o pro-oxidantes como interferón gamma (INF- γ), Factor de Necrosis Tumoral- alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, óxido nítrico (ON) y O_2^- se encontrarían circulando en la periferia de forma crónica; alcanzando al SNC después de atravesar la BHE, la cual en condiciones íntegras regula el transporte de células y moléculas entre la sangre y el cerebro, pero cuya función puede verse comprometida ante ciertas condiciones como son hipertensión, tumores, radiación, infecciones, enfermedades metabólicas y envejecimiento. Una vez dentro del SN, el proceso inflamatorio continúa, orquestado por los dos principales componentes del sistema inmune innato dentro del SNC, la microglía y los astrocitos.

La microglía son los macrófagos residentes del cerebro, tienen un origen mieloide y en condiciones de salud tiene un rol fagocítico, removiendo neuronas dañadas y patógenos, y al mismo tiempo promueve la reparación del tejido dañado. Por otro lado, los astrocitos también constituyen células gliales especializadas que remueven restos celulares ("debris") y posibles toxinas, a la vez que liberan factores neuroprotectores. Durante la neuroinflamación (y en la EA) la proliferación de ambos

tipos celulares aumenta y su morfología se modifica en un proceso denominado gliosis, en el cual además son liberadas moléculas pro-inflamatorias, amplificando el proceso inflamatorio y llevando a daño en el tejido.

1.7.- Anti-inflamatorios no esteroideos y EA.

La relación entre la EA y los procesos inflamatorios es tan clara que incluso epidemiológicamente se ha asociado la administración de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) durante periodos prolongados (2-3 años) en fases tempranas de la enfermedad, con una reducción en la incidencia de ésta en pacientes asintomáticos (Breitner, 2011); sin embargo este tipo de medicamentos están lejos de representar al tratamiento óptimo, ya que su consumo crónico lleva a efectos no deseados como son gastropatías (Lazzaroni, 2004) y eventos vasculares (Kearney, 2006).

1.8.- Modelos de neuroinflamación asociados a EA.

Con el fin de generar nuevo conocimiento alrededor de la EA existen diversos modelos experimentales, dentro de los que se encuentran los que utilizan animales transgénicos (comúnmente ratones o ratas) con una o varias mutaciones, ejemplo de estos son los animales 3×Tg (mutación sueca en APP, P301L en tau y PS1M146V knock-in), los Tg2576 (mutación sueca en APP) o los 5XFAD (mutaciones sueca, florida y Londres en APP, y M146L y L286V en PS1), donde algunos llegan a reproducir fielmente muchas de las marcas de la enfermedad entre los 6 y 13 meses.

No obstante, la etiología de la enfermedad “no familiar” o tardía (95% de los casos de EA) no se encuentra basada en mutaciones, por lo que también se han desarrollado algunos otros modelos que, aunque no llegan a recapitular de forma tan extensa las características de la enfermedad, sí ofrecen la ventaja de tener un origen de tipo ambiental y en algunos casos de ser de duración más corta.

Dentro de los anteriores se encuentran los modelos de neuroinflamación asociada a la EA, para los cuales se administra de forma intracerebroventricular (ICV) o sistémica algún agente pro-inflamatorio. Ejemplos de esto son: (1) administración periférica o ICV de estreptozotocina (STZ), donde los animales desarrollan un desbalance metabólico que conlleva a inflamación y muestran daños en plasticidad neuronal, deficiencia cognitiva, neurodegeneración, agregados amiloides y pérdida sináptica (Chen, 2013); (2) inyección gestacional de ácido polyribonucleico-polyribocitidílico (PolyI:C), el cual induce una respuesta inmune innata análoga a la observada en infecciones virales, donde los animales adultos producen altos niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , presentan microgliosis, y en

etapas muy tardías (hasta 20 meses de edad) desarrollan hiperfosforilación de tau, amiloidogénesis y deficiencia cognitiva (Krstic, 2012); e (3) inflamación inducida por LPS, el cual representa un modelo comúnmente estudiado para el que existen diferentes esquemas de inducción (variando en vía y tiempo de administración), y dependiendo de esto puede observarse déficit cognitivo, gliosis, niveles exacerbados de citosinas pro-inflamatorias y en ciertos casos, agregados amiloides y pérdida neuronal (Pintado, 2012; Lykhmus, 2016; Woong, 2008).

Siendo de gran interés la asociación entre condiciones que conllevan una inflamación sistémica (ej. hipertensión, infecciones, obesidad, etc.) y el desarrollo de la EA, algunos esquemas de neuroinflamación inducida por LPS, contemplan una administración intraperitoneal (i.p) en dosis que varían comúnmente de 100 mg/kg a 1 g/kg durante tiempos bastante variables. Una vez que el LPS ha sido inyectado en el animal, se inicia la transcripción y liberación de citosinas pro inflamatorias de manera muy rápida, por lo que incluso en tiempos cortos (un par de semanas) es posible detectar algunos indicadores similares a los presentes en la EA (Woong, 2008; Lykhmus, 2015).

1.9.- Tratamientos para la EA.

Como ya se mencionó, los medicamentos comúnmente usados para el tratamiento de la EA se basan en la hipótesis que sugiere que una disfunción en la vía colinérgica dentro de SNC posee un papel esencial en el declive observado en los pacientes que la padecen. Así, la mayoría de fármacos usados para el tratamiento de esta enfermedad se enfocan en compensar esta disfunción principalmente a través de inhibidores de la acetil-colinesterasa. Ejemplos de estos son Donezepil, Rivastigmina y Galantamina. De igual forma, otros medicamentos comúnmente administrados a los pacientes con EA incluyen los antagonistas de receptores NMDA (receptor de glutamato) y algunos anti-psicóticos (Burns, 2003; Alzheimer Association, 2012).

Es importante señalar que durante este padecimiento es muy común encontrar la prescripción de múltiples fármacos para contrarrestar los diferentes síntomas presentes, los cuales a mejoran la calidad de vida durante un tiempo limitado, pero no logran evitar la progresión de la enfermedad. Debido a la falta de tratamientos efectivos, resulta necesaria la búsqueda de nuevas alternativas, entre las que se encuentran diferentes productos derivados de organismos vegetales.

Dos ejemplos son el Tripchlorolide (T4) y la Arctigenina, ambos con mecanismos específicos para ejercer su efecto, aunque no del todo conocidos. El primero (T4) derivado de la planta china *Tripterygium wilfordii*, muestra un efecto neuroprotector en ratones transgénicos 5XFAD, ya que mejora

su aprendizaje espacial y memoria, disminuye la pérdida sináptica y promueve la activación de la vía fosfoinositol-3-cinasa-Akt, además de reducir los niveles de β A y la expresión de β -secretasa (Zeng, 2015). El segundo ejemplo, la Arctigenina, compuesto derivado de *Arctium lappa* es capaz de disminuir la traducción de β -secretasa vía defosforilación de el F2 α , inhibiendo así la producción de β A, además de promover la eliminación del mismo al favorecer la autofagia a través de AMPK y mTOR, con lo que logra disminuir el daño en la memoria en un modelo murino transgénico (Zhu, 2013).

2.- ANTECEDENTES

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

2.1.- Generalidades de *Malva parviflora*.

Malva parviflora es una planta herbácea con sinonimia popular que varía dependiendo de la región, nombrándose por ejemplo como hala, malva, malva de campo, malva de castilla y malva de quesitos, entre otros (Argueta, 1994).

Su clasificación taxonómica es (The Taxonomicon, 2015):

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

Malva parviflora es originaria de Europa e introducida en América, con un uso frecuente y extendido en nuestro país actualmente. Crece principalmente en bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y bosque espinoso, también se asocia a vegetación perturbada, creciendo a la orilla del camino y en terrenos de cultivo abandonados (Argueta, 1994).

Esta especie tiene una altura aproximada de 60 cm; con hojas simples, reniformes, crenadas, onduladas, con peciolo largo y de hasta 4.5 cm de longitud y 7 cm de ancho; con flores pequeñas, de color lila o blanco, en inflorescencias de 1 a 4 flores; semillas reniformes; y fruto circular u ovado de 2 mm aproximadamente (Espinosa, 1997).

Sus usos médicos tradicionales incluyen su consumo como tratamiento anti-inflamatorio en caso de golpes, heridas o abscesos; así como durante la inflamación de garganta, estómago, intestino, mucosas, riñones y pulmones entre muchos otros. Además de su uso como anti-inflamatorio, también se acostumbra para disminuir la fiebre, como analgésico en ciertos casos, como anti-helmíntico y para tratar lesiones leves en la piel. Comúnmente se recomienda beber el cocimiento o en forma de fomentos o emplastos (Argueta, 1994).

2.2.- Reportes químicos de *Malva parviflora*

Malva parviflora es una planta que ha sido poco caracterizada químicamente; sin embargo, se sabe de su contenido rico en flavonoides y compuestos fenólicos (Farhan, 2012; Lagunas, 2009). Igualmente se ha reportado que en partes aéreas contiene saponinas, alcaloides, resinas y taninos (Farhan, 2012), además de flavonoles (un tipo de flavonoide), fenilpropanoides, aminoácidos aromáticos y terpenos (Lagunas, 2009). Por último, dentro del grupo de investigación se ha determinado recientemente, que el extracto hidro-alcohólico contiene escopoletina (una cumarina) y ácido oleanólico (un triterpeno) (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

2.3.- Reportes Farmacológicos de *Malva parviflora*

Existen ya diversos reportes de su actividad farmacológica, entre los que se encuentran su actividad como: quelante de metales a través de un extracto metanólico de hojas (Bouriche, 2011); antibacteriano en los extractos hexánico, metanólico y acuoso de hojas y raíces (Shale, 2005); anti-fúngico utilizando un buffer de extracción en semillas (Wang, 2001); hipoglucemiante con los extractos hexánico, clorofórmico, y metanólico de hojas (Pérez-Gutiérrez, 2012); anti-hipertensivo en un extracto hidro-alcohólico y sus fracciones acuosa y orgánica de hojas (Lagunas, 2009); anti-oxidante, tanto al usar el extracto metanólico (Bouriche, 2011), como el extracto hidro-alcohólico y sus fracciones acuosa y orgánica en hojas (Lagunas, 2009); anti-inflamatorio a través de los extractos metanólico, hexánico y acuoso de hojas y raíces (Bouriche, 2011; Shale, 2005); y neuroprotector tanto en el extracto

etanólico de hojas como en el hidro-alcohólico de partes aéreas (Aslam, 2014; Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

Estudios previos realizados por Lagunas H. y Pérez-Gutiérrez y colaboradores, han evidenciado un efecto positivo de *Malva parviflora*, sobre la regulación de alteraciones metabólicas tanto en un modelo de hipertensión inducido mediante Angiotensina II como en uno de diabetes tipo I inducido con streptozotocina. Para el primer caso, se observó una disminución en los niveles de presión arterial, malonildialdehído en riñones y aorta, así como proteína C reactiva (parámetros asociados con estrés oxidante e hipertensión arterial crónica respectivamente), (Lagunas, 2009). Para el segundo caso se observó un efecto hipoglucémico y regulador de los niveles de colesterol total, triglicéridos y peroxidación lipídica (Pérez-Gutiérrez, 2012).

Por otra parte, recientemente en nuestro grupo se generó y caracterizó de forma preliminar un extracto hidro-alcohólico de *M. parviflora* para el cual, como ya se mencionó, se determinó que contiene escopoletina (una cumarina) y ácido oleanólico (un triterpeno) (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación), ambos con actividad anti-inflamatoria (Ding, 2008; Chang, 2012; Lee, 2013, Singh, 1992; Lee, 2007; Boiuc, 1996) y neuroprotectora reportada anteriormente (Son, 2007; Caltana, 2014; Caltana, 2015; Babongile, 2014; Li-hua, 2015). Así mismo, de forma coherente con lo anteriormente reportado, se encontró que el extracto hidro-alcohólico (MpHA) posee actividad anti-inflamatoria, ya que inhibe la activación de NF- κ B y AP-1 en macrófagos *in vitro* (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

Interesantemente, se encontró que la administración crónica del MpHA ejerce un efecto benéfico en un modelo murino transgénico de la EA (5XFAD) el cual presenta un proceso inflamatorio exacerbado por la administración crónica de una dieta alta en grasa; siendo capaz de disminuir la deposición del péptido β A, la astrogliosis reactiva y la pérdida de neuronas, a la vez que mejoró el desempeño cognitivo tanto en los animales alimentados con dieta alta en grasa como con dieta normal (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

Sumado a lo anterior, también ya se ha determinado que este extracto disminuye la activación clásica de la microglía (Activación clásica -M1-: caracterizada por secretar citosinas pro-inflamatorias y promover el daño neuronal) y aumenta su capacidad fagocítica, datos que sugieren a la microglía como uno de los blancos terapéuticos de *M. parviflora* para la atenuación de la EA.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los cambios sustanciales en la pirámide poblacional, en la que se observa un incremento en la proporción de adultos mayores, ha conducido al aumento en la prevalencia de enfermedades ligadas al envejecimiento; de éstas, las enfermedades neurológicas como la EA, son de particular importancia. Los parámetros fisiopatológicos de este trastorno incluyen el deterioro en la disponibilidad sináptica de acetilcolina, la formación de ovillos neurofibrilares y la deposición del péptido β -amiloide, conduciendo inevitablemente a déficit cognitivo. Los procesos inflamatorios desarrollados antes o durante el progreso de dicha enfermedad han mostrado desempeñar un papel muy importante dentro de la cascada neurodegenerativa presente. Diversos modelos biológicos han sido usados en la búsqueda de terapias útiles para esta enfermedad, que permitan detener o retardar la sintomatología, y mejorar la calidad de vida de las personas afectadas. Las plantas medicinales resultan de gran interés, como fuente de metabolitos secundarios que en su conjunto son capaces de ejercer diferentes acciones biológicas que permiten contrarrestar o disminuir procesos patológicos asociados, en este caso, a la EA. Se ha demostrado que el extracto hidro-alcohólico de *Malva parviflora* posee efecto antioxidante y anti-inflamatorio, además de mejorar el déficit cognitivo en ratones 5XFAD con dieta hipercalórica, sin embargo, dada la riqueza de compuestos presentes en este extracto, su caracterización química y farmacológica integral resulta muy compleja, por lo que en este proyecto se generó y seleccionó según su actividad anti-inflamatoria, una fracción químicamente menos compleja que el MpHA, la cual se evaluó en un modelo murino de neuroinflamación asociado a la EA.

4.- HIPÓTESIS.

Una fracción del extracto de diclorometano de *Malva parviflora* con propiedades anti-inflamatorias, mejora la capacidad cognitiva en un modelo murino de neuroinflamación.

5.- OBJETIVO.

Identificar una fracción de *Malva parviflora* con propiedades anti-inflamatorias, que ejerza un efecto neuroprotector en un modelo murino de neuroinflamación.

5.1.- Objetivos particulares:

1. Seleccionar mediante una evaluación química-biodirigida una fracción con propiedades anti-inflamatorias de *Malva parviflora*.
2. Evaluar el efecto farmacológico de la fracción con mayor actividad anti-inflamatoria sobre el desarrollo de algunas marcas presentes en la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino de neuroinflamación.
3. Identificar, aislar y elucidar la estructura de al menos un compuesto presente en la fracción con actividad biológica.
4. Evaluar la actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora del compuesto aislado.

6.- MATERIALES Y METODOS

6.1.- Selección química-biodirigida de fracción con propiedades anti-inflamatorias de *Malva parviflora*.

6.1.1.- Evaluación de diferentes extractos de *Malva parviflora* potencial anti-inflamatorio en un modelo de edema auricular inducido con TPA.

Con el objetivo de evaluar el potencial anti-inflamatorio de diferentes extractos de *M. parviflora*, se llevaron a cabo ensayos en un modelo murino de edema auricular inducido con 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) en el Centro de investigaciones Biomédicas del Sur (CIBIS)-IMSS en colaboración con la Biol. Vargas-Villa.

Se formaron seis grupos de seis animales cada uno, en cada animal se aplicó de forma tópica 1 mg/oreja de TPA (Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA) en la oreja izquierda, mientras que la derecha fue utilizada como control. Quince minutos antes de la aplicación de TPA, los diferentes tratamientos (proporcionados por el CIBIS-IMSS: extracto hidro-alcohólico –MpHA-, extracto de diclorometano –MpD-, extracto acetónico –MpA-, extracto metanólico–MpM-, Indometacina –Indo-, vehículo –Veh-) fueron aplicados (2 mg/oreja) en la oreja izquierda; cuatro horas después, los animales fueron sacrificados y se obtuvo una muestra circular con un diámetro de 5 mm de cada oreja, las cuales fueron pesadas para determinar el tamaño del edema (diferencia de peso entre la oreja inflamada y la control). La actividad anti-inflamatoria se calculó como porcentaje de inhibición del edema comparado con el grupo que únicamente recibió vehículo como tratamiento.

6.1.2.- Fraccionamiento del extracto de *M. parviflora* con mayor actividad anti-inflamatoria y elucidación estructural de un compuesto aislado.

Siendo el extracto de diclorometano de *M. parviflora* (MpD) el de mayor actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema auricular; se llevó a cabo una nueva obtención y fraccionamiento del mismo. Para esto, junto con la Biol. Gabriela Vargas Villa (CIBIS-IMSS), se maceraron 2 kg de partes aéreas de la planta en 20 L de solvente durante 24 horas, dos veces; posteriormente se retiró el solvente mediante un evaporador rotatorio. El extracto resultante se fraccionó por cromatografía en columna abierta de fase normal con sílica gel como fase estacionaria y un gradiente de hexano-acetona como fase móvil, de donde se obtuvieron una serie de fracciones cuyo perfil químico fue monitoreado por

cromatografía en capa fina; y un compuesto aislado, cuya conformación estructural se determinó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

6.1.3.- Evaluación de diferentes fracciones del MpD con potencial anti-inflamatorio en un modelo de edema auricular inducido con TPA.

Las fracciones y el compuesto resultantes del fraccionamiento del MpD fueron evaluadas en el mismo modelo de edema auricular utilizado para la evaluación de los diferentes extractos (descrito en la parte superior), con una única modificación en la dosis de los tratamientos (Fracción 5 –MpF5-, fracción 6c –MpF6c-, fracción 6s –MpF6s-, fracción 7 –MpF7-, fracción 10 –MpF10-, fracción 12 –MpF12-, compuesto aislado –MpDau-, Indometacina –Indo-, vehículo –Veh-), la cual fue de 1 mg/oreja.

6.1.4.- Evaluación de dos fracciones y un compuesto aislado con potencial anti-inflamatorio en macrófagos RAW-Blue.

Se llevó a cabo la evaluación de dos fracciones y un compuesto aislado (MpF7, MpF10, MpDau) con potencial efecto anti-inflamatorio, en un modelo *in vitro* usando macrófagos murinos RAW-Blue, lo cuales poseen un gen reportero inducible por NF- κ B y AP-1; específicamente, tiene insertado en su genoma de manera estable el cDNA que codifica para una fosfatasa alcalina secretable. Los niveles de la fosfatasa alcalina se miden en el medio de cultivo por colorimetría, para lo que se colectan 150 μ l de medio, que son mezclados con 50 μ l del reactivo QUANTI-Blue (InvivoGen).

El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor de la línea celular (InvivoGen, USA. Código de catálogo: Raw-Sp). Se sembraron 100,000 células (con 200 μ l de medio DMEM) por pozo en placas de 26 pozos, donde se les agregó diferentes concentraciones de los tratamientos derivados de *M. parviflora* (MpDau: 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 40 y 80 μ g/ml; MpF7 y MpF10: 10, 20, 40, 80 μ g/ml.- MpD: 2.5, 5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml) y un estímulo pro-inflamatorio de LPS (20 ng/ml). Las células fueron incubadas a 37°C durante 12 horas y posteriormente se colectaron 50 μ l del medio en el que se encontraban, a partir de éste se midió mediante un ensayo colorimétrico (QUANTI-Blue - InvivoGen) la cantidad de fosfatasa alcalina secretada, indicador de la actividad de NF- κ B y AP-1, factores de transcripción importantes en procesos inflamatorios.

6.2.- Efecto farmacológico de una fracción y un compuesto con actividad anti-inflamatoria en un modelo murino de neuroinflamación asociado a la EA.

Los tratamientos seleccionados por su mayor actividad anti-inflamatoria se evaluaron en un modelo murino de neuroinflamación asociado a la EA; para lo cual se inyectó de forma intraperitoneal (i.p.) una dosis diaria de 125 µg/kg de LPS durante 7 días a ratones hembra ICR de entre 25 y 30g. Los animales se mantuvieron en condiciones estables, con temperatura controlada, ciclos de luz de 12h:12h y acceso libre a agua y alimento (pellets, dieta para ratón Envigo). Los experimentos se llevaron a cabo entre las 8:00 am y 12:00 pm. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Posterior a las inyecciones consecutivas de LPS, los animales recibieron los diferentes tratamientos por vía oral (v.o.) (Fig.1 A). Se formaron 8 grupos (n=6), uno de los cuales recibió únicamente vehículo (Veh) para simular la manipulación; quedando: 1) Veh i.p. + Veh v.o., 2) LPS i.p. + Veh v.o., 3) LPS i.p. + MpF10 (5 mg/kg) v.o., 4) LPS i.p. + MpF10 (10 mg/kg) v.o., 5) LPS i.p. + MpF10 (20 mg/kg) v.o., 6) LPS i.p. + MpDau (2 mg/kg) v.o., 7) LPS i.p. + MpHA (50 mg/kg) v.o. y 8) LPS i.p. + Indometacina (50 mg/kg) v.o.

6.2.1.- Evaluación de aprendizaje y memoria espacial en Laberinto Acuático de Morris (LAM).

Con el objetivo de evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria de los animales, se realizó la prueba de laberinto acuático de Morris (LAM) la cual es una prueba de aprendizaje y memoria espacial en la que los animales deben aprender a guiarse con ayuda de señales visuales desde distintas ubicaciones de inicio. La prueba se realizó utilizando una tina con un diámetro aproximado de 150 cm, dentro de la cual se encontraba una plataforma ligeramente sumergida en agua teñida de color blanco (Fig. 1B).

La prueba de LAM se encuentra dividida en dos etapas, el aprendizaje (o adquisición) y la prueba de memoria (Fig. 1A). Para la etapa de aprendizaje, los animales recibieron entrenamiento diario durante 5 días consecutivos, durante los cual se les colocó desde 4 puntos diferentes de inicio (N, O, S, E) cada día y se les dejó explorar libremente durante 60 segundos o hasta que lograron encontrar la plataforma de escape; si el animal no llegó a la plataforma, se le condujo hasta ella y permaneció ahí por 30 segundos. Para la prueba de memoria, la plataforma de escape es retirada y los animales son colocados en los puntos de inicio de igual forma que durante el entrenamiento.

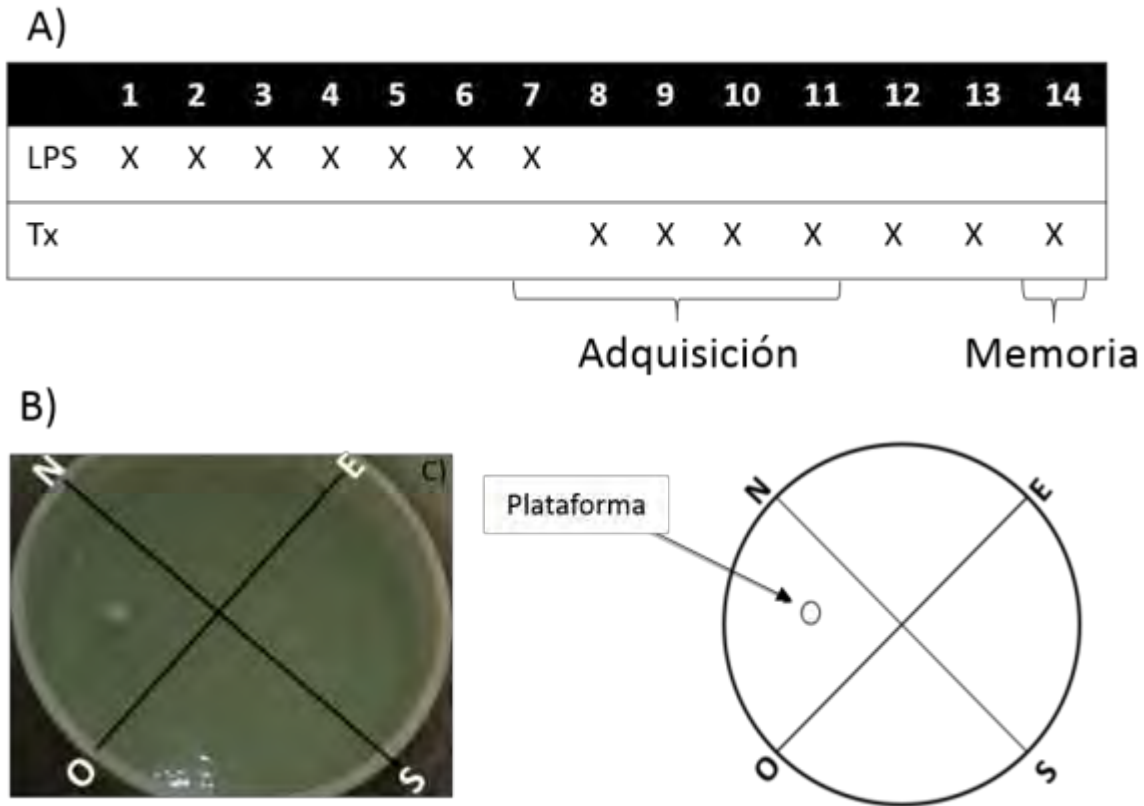


Fig. 1. Modelo murino de neuroinflamación inducido por LPS. A) Esquema de administración, B) Fotografía y esquema de Laberinto acuático de Morris (LAM).

6.2.2.- Determinación de astrogliosis reactiva por inmunohistoquímica.

Los animales fueron anestesiados y perfundidos vía intracardíaca con solución salina y paraformaldehído al 4% pH7.4. Los cerebros fueron removidos y a partir de estos se obtuvieron cortes sagitales de 30 μm de grosor. Las tinciones de inmunohistoquímica se llevaron a cabo usando el método de secciones flotantes.

Las secciones fueron expuestas a citrato de sodio a 90°C durante cinco minutos para llevar a cabo la recuperación antigénica, posteriormente se bloquearon las peroxidases endógenas con H_2O_2 0.3% en metanol por 10 minutos, seguido de tres lavados en PBS-T (PBS 0.25% Tritón X-100) y una pre-incubación en buffer de bloqueo (PBS-T 0.1 % suero fetal bovino) durante una hora. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo primario contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés) (AB_561049; 1:250) a 4°C durante toda la noche, para después ser lavadas con PBS-T dos veces e incubadas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa por dos horas, seguido de 3

lavados más con PBS-T. La inmunoreacción fue identificada mediante un kit DAB (BD Pharmigen) y las secciones fueron montadas en cubreobjetos.

Las imágenes fueron tomadas en campo claro con un microscopio Zeiss Axioskop de EpiFluorescencia y una cámara Nikon coolpix 5000 con adaptador coolpix MDC lens Nikon UR-ER. Nuestras observaciones iniciales revelaron cambios principalmente en hipocampo, por lo que la cuantificación se realizó en esa zona.

La inmunoreactividad fue medida de forma semi-cuantitativa como el porcentaje de área marcada. Seis campos diferentes fueron analizados en el programa ImageJ, donde las imágenes se cambiaron a escala de grises y se convirtieron a imágenes binarias (señalando cada pixel como negativo o positivo para el marcaje). El porcentaje de área marcada como positiva fue determinado.

6.3.- Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en el software GraphPad Prism usando una prueba ANOVA de una vía y una post-prueba de Tukey o de Bonferroni según lo indicado al pie de figura, con un valor de significancia de $p = \alpha < 0.05$.

7.- RESULTADOS.

7.1.- Selección química-biodirigida de fracción con propiedades anti-inflamatorias de *Malva parviflora*.

Como ya se mencionó anteriormente la neuroinflamación juega un papel muy importante durante el proceso de iniciación de la cascada neurodegenerativa presente en la enfermedad de Alzheimer. Por lo que con el objetivo de encontrar una fracción derivada de *M. parviflora* con propiedades anti-inflamatorias, se llevó a cabo una selección biodirigida. Dicha selección se basó en la actividad anti-inflamatoria que presentaron los diferentes extractos y fracciones evaluados en dos modelos biológicos distintos (edema auricular y macrófagos RAW Blue); seleccionándose las de mayor actividad.

7.1.1.- Evaluación de extractos derivados de *M. parviflora* en modelo de edema auricular.

De forma inicial se evaluaron en el modelo de edema auricular, cuatro diferentes extractos obtenidos a partir de *M. parviflora*, (proporcionados por el CIBIS-IMSS) cuya actividad fue comparada con la de un AINE comercial, la Indometacina (Indo). Los extractos fueron: 1) extracto hidro-alcohólico -MpHA-, 2) extracto de diclorometano -MpD-, 3) extracto acetónico -MpAc- y 4) extracto metanólico -MpM. A partir de este experimento, se calculó el porcentaje de inhibición del edema para cada tratamiento respecto al obtenido al utilizar únicamente vehículo (Veh).

Como resultado, se observó que los extractos con mayor actividad fueron el MpD y el MpAc con 60.01 % y 60.21 % de inhibición del edema, seguido por el MpHA (39.39%) y el MpM (32.0%) (Fig. 2A); por lo que se seleccionó al MpD para su consecuente fraccionamiento y evaluación.

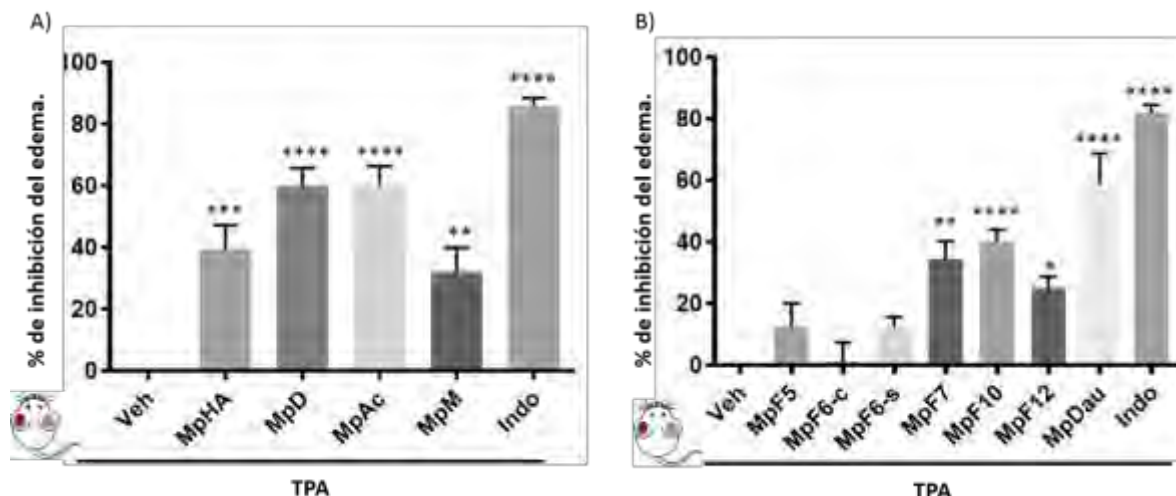


Fig. 2. Efecto anti-inflamatorio en edema auricular inducido con TPA. Porcentaje de inhibición de edema auricular inducido por TPA por diferentes A) extractos (extracto hidro-alcohólico –MpHA-, extracto de diclorometano –MpD-, extracto acetónico –MpA-, extracto metanólico –MpM) y B) fracciones y compuesto aislado (fracción 5 –MpF5-, fracción 6c –MpF6c-, fracción 6s –MpF6s-, fracción 7 –MpF7-, fracción 10 –MpF10-, fracción 12 –MpF12-, compuesto aislado –MpDau-, Indometacina –Indo-) derivados de *M. parviflora*. ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey ($p = 0.05$). Significancia respecto a TPA + Veh.

7.1.2.- Fraccionamiento de MpD y obtención de compuesto aislado.

En base al elevado porcentaje de inhibición del edema auricular que presentó el MpD, se llevó a cabo su fraccionamiento. A partir de éste se obtuvieron 249 fracciones que fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (datos no mostrados) y reagrupadas en base a la similitud en su perfil cromatográfico en 12 nuevas fracciones. Durante este procedimiento logró aislarse un compuesto puro, el cual aparecía como precipitado en varias de las fracciones al momento de reducir por evaporación el volumen en el que se encontraban disueltas. Dicho compuesto fue analizado por RMN, determinando que se trataba de Daucosterol (un glucósido de β -sitosterol) (Fig. 3A y B).

El Daucosterol aislado (MpDau) fue comparado con un estándar analítico de la misma identidad (Est Dau - β -sitosterol β -D-glucósido, Sigma-Aldrich-) y se determinó su presencia en MpD y MpF10 a través de cromatografía en capa fina, no así en MpF7, la cual no lo contiene (Fig. 3C). Sin embargo, en las condiciones de preparación de la placa mostrada en la figura 3C no es posible observar el perfil químico de MpHA, utilizado más adelante como control debido a que ya se ha determinado dentro del laboratorio su actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora.

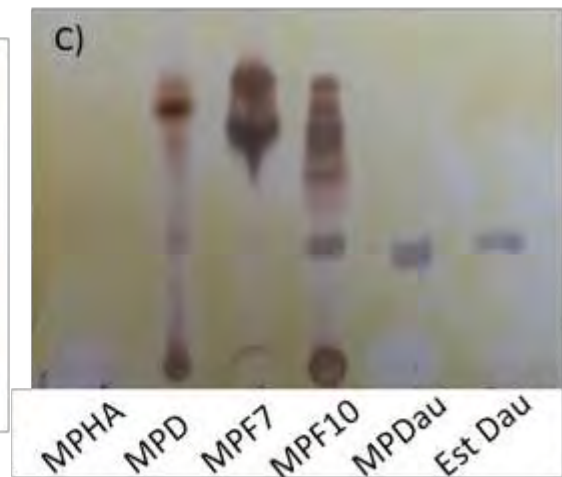
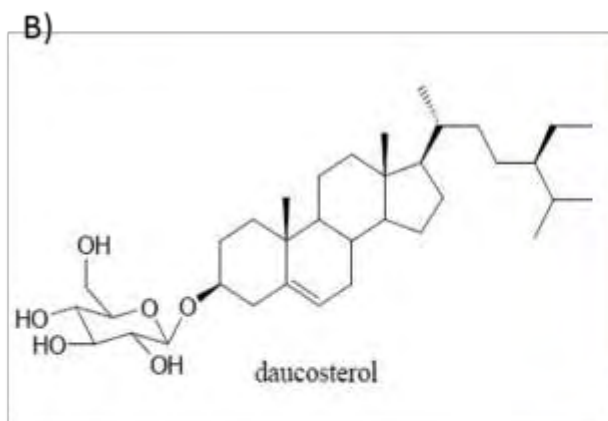
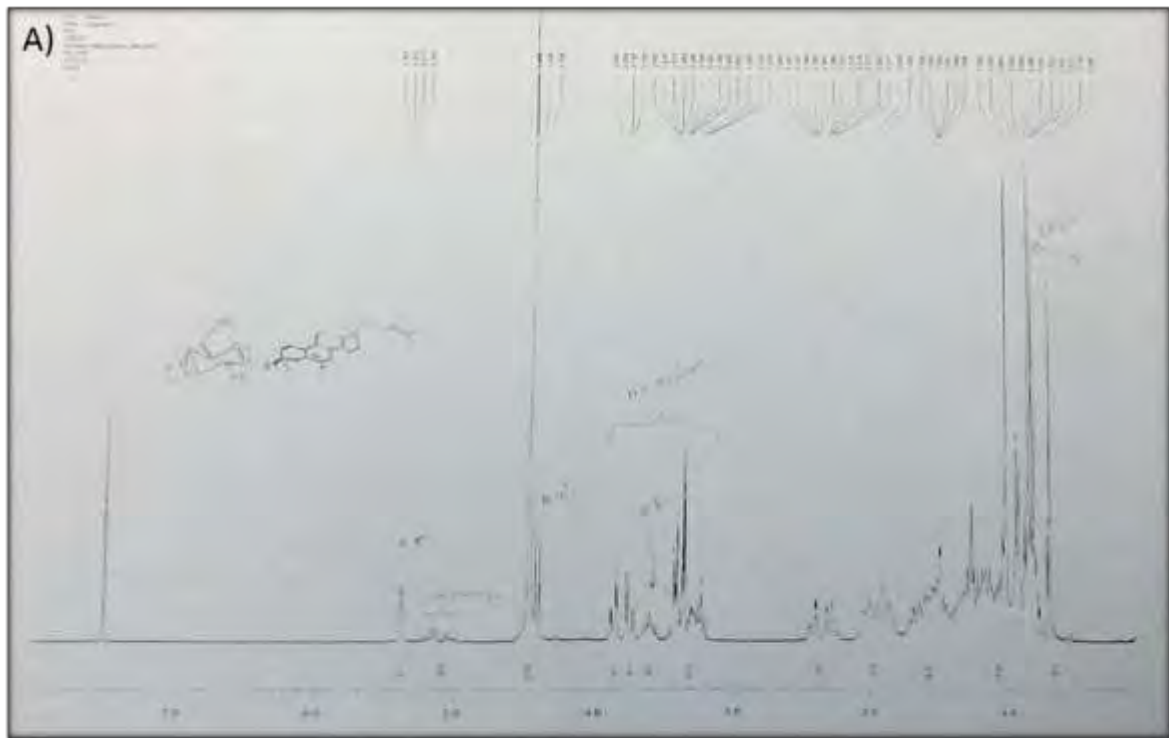


Fig. 3. Elucidación estructural de compuesto aislado y presencia del mismo en MpF10. A) Espectro de RMN del compuesto aislado de *M. parviflora*. B) Estructura de Daucosterol. C) Cromatografía en capa fina comparando MpHA, MpD, MpF7, MpF10, compuesto aislado (MpDau) y estándar analítico de Daucosterol (Est Dau). Para C) fase estacionaria: sílica gel fase normal, fase móvil: diclorometano: metanol (9:1), revelador: sulfato cérico.

7.1.3.- Evaluación de fracciones y compuesto aislado de MpD en modelo de edema auricular.

Las fracciones y el compuesto resultantes se evaluaron en el mismo modelo de edema auricular utilizado anteriormente para la evaluación de los extractos. Resultando con mayor actividad anti-inflamatoria las fracciones MpF7 y MpF10 con 34.41% y 40.21 % de inhibición del edema respectivamente, así como el compuesto aislado (MpDau) con 58.7 % de inhibición (Fig. 2B).

7.1.4.- Evaluación de fracciones y compuesto aislado de MpD en macrófagos RAW Blue.

Dado que las fracciones MpF7 y MpF10, así como el compuesto aislado (MpDau) resultaron los de mayor actividad en el modelo de edema auricular, se decidió evaluar su capacidad anti-inflamatoria junto con la del extracto de origen (MpD) en un modelo *in vitro*, utilizando macrófagos de la línea celular RAW-Blue. Lo anterior con el objetivo de confirmar su actividad anti-inflamatoria y realizar curvas de concentración- respuesta que más adelante permitieran calcular un rango de dosis adecuadas para el modelo murino.

Previo a la evaluación en el modelo in-vitro, se determinó el vehículo más adecuado para la realización de las pruebas. El primer vehículo que se intentó utilizar fue Buffer salino de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés), el cual en ocasiones anteriores dentro del grupo de investigación se había utilizado para disolver el MpHA, sin embargo, ninguno de los tratamientos propuestos logró disolverse adecuadamente. Posteriormente, basándonos en la literatura, se decidió probar con dimetilsulfóxido (DMSO) manteniendo su concentración final por debajo del 0.1%; obteniendo resultados similares a los anteriores al no lograr su solubilización hasta que se elevaba el porcentaje de DMSO a niveles alrededor del 10%, produciendo un grave daño en las células tratadas (datos no mostrados). Finalmente, los tratamientos lograron disolverse en Tween-20 con concentraciones finales no mayores a 0.024%, no observándose por microscopía, alteraciones aparentes en las células expuestas.

Una vez identificado el vehículo adecuado, se prosiguió a realizar los ensayos de actividad. Los resultados se normalizaron respecto a células tratadas con LPS + Vehículo.

Considerando que en nuestro grupo de investigación ya se tenían antecedentes del MpHA en este mismo modelo de células Raw-Blue, se realizó un análisis de dosis-respuesta utilizando las concentraciones de 100, 500 y 1000 µg/ml del mismo. De acuerdo a lo observado previamente, detectamos un efecto anti-inflamatorio del extracto MpHA dependiente de la concentración (Fig. 4).

Posteriormente, para la evaluación del extracto de diclorometano (MpD), se probaron las mismas concentraciones utilizadas para el MpHA. Sin embargo, debido a que a 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ la viabilidad de las células parecía afectada (datos no mostrados), se decidió recorrer el rango hacia unas menores concentraciones, evaluándose a 2.5, 5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ sin encontrar efectos deletéreos de ningún tipo visibles al observar al microscopio (Fig. 5B y C).

Dentro del rango de concentraciones evaluadas para el MpD se observó un efecto anti-inflamatorio dependiente de la concentración, donde a 200 $\mu\text{g/ml}$ se alcanzó un 81.7% de inhibición de NF κ B y AP-1, seguido por 70.5 % a 100 $\mu\text{g/ml}$ y 52.5 % a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 5A).

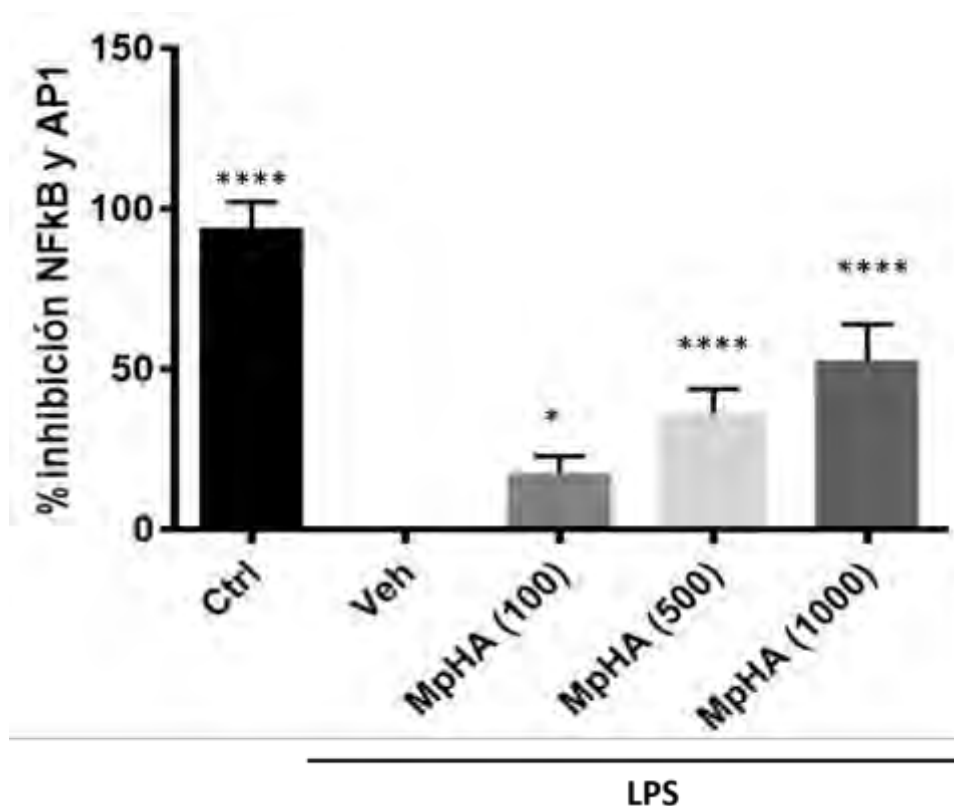


Fig. 4. Efecto anti-inflamatorio del extracto hidro-alcohólico *M. parviflora* (MpHA) en macrófagos RAW-Blue. Porcentaje de inhibición de NF κ B y AP-1 en macrófagos RAW-Blue, utilizando diferentes concentraciones (100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$) del extracto hidro-alcohólico de *M. parviflora*. Vehículo: tween 20 con una concentración final no mayor a 0.0024 %. (n=5). ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey ($p = \text{ó} < 0.05$). Significancia respecto a LPS + Veh.

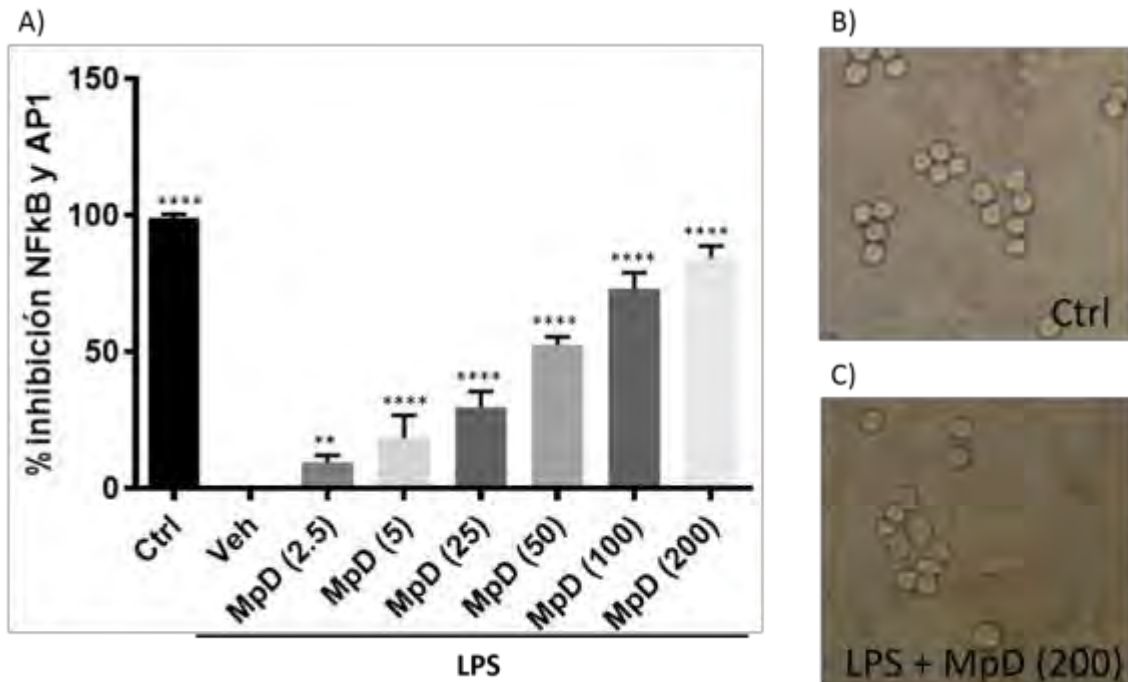


Fig 5. Efecto anti-inflamatorio del extracto de diclorometano de *M. parviflora* (MpD) en macrófagos RAW-Blue. A) Porcentaje de inhibición de NFκB y AP-1 en macrófagos RAW-Blue, utilizando diferentes concentraciones (2.5, 5, 25, 50, 100, 200 µg/ml) del extracto de diclorometano de *M. parviflora*. Vehículo: tween 20 con una concentración final no mayor a 0.0024% . (n=5). ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey ($p = \text{ó} < 0.05$). Significancia respecto a LPS + Veh. B) Células sin ningún tratamiento (ctrl). C) Células con LPS más MpD a 200 µg/ml.

Posteriormente, evaluamos la actividad anti-inflamatoria de las fracciones MpF7 y MpF10 en el mismo modelo de células *in-vitro*. Las concentraciones (10, 20, 40 y 80 µg/ml) utilizadas se determinaron con base en reportes previos donde se evaluaba la actividad de fracciones en modelos similares; principalmente en el trabajo de Hoo R y colaboradores (Hoo, 2010) donde se probaron dos fracciones (10 y 20 µg/ml) derivadas de *Radix astragali* (planta herbácea) en el mismo modelo de macrófagos RAW-Blue.

Como resultado de los ensayos realizados con la MpF7 a las concentraciones señaladas (10, 20, 40 y 80 µg/ml), no se observó una actividad anti-inflamatoria importante (en comparación con MpHA, MpD, Mp10 o MpDau), con una actividad en promedio de 28.58 % a la concentración de 80 µg/ml (Fig. 6). No obstante, a las mismas concentraciones con la MpF10 se observó que posee un efecto anti-inflamatorio dependiente de concentración, teniendo como valor máximo, una inhibición del 69.74 % (80 µg/ml) y como mínimo una de 21.0 % (10 µg/ml) (Fig. 7A). Además, observamos que en ninguna de las repeticiones realizadas, las células sufrieron alguna alteración visible al microscopio (Fig. 7B y

C). Adicionalmente, ya que la MpF10 presentó una actividad anti-inflamatoria importante, y en ese momento no se contaba con la suficiente cantidad para evaluarla en nuestro modelo murino, decidimos realizar una nueva preparación a partir del MpD y evaluar nuevamente, el efecto anti-inflamatorio de esta nueva preparación en el modelo de las células Raw-Blue. Los resultados obtenidos fueron iguales a los observados la primera vez, lo que nos indica que su elaboración es reproducible.

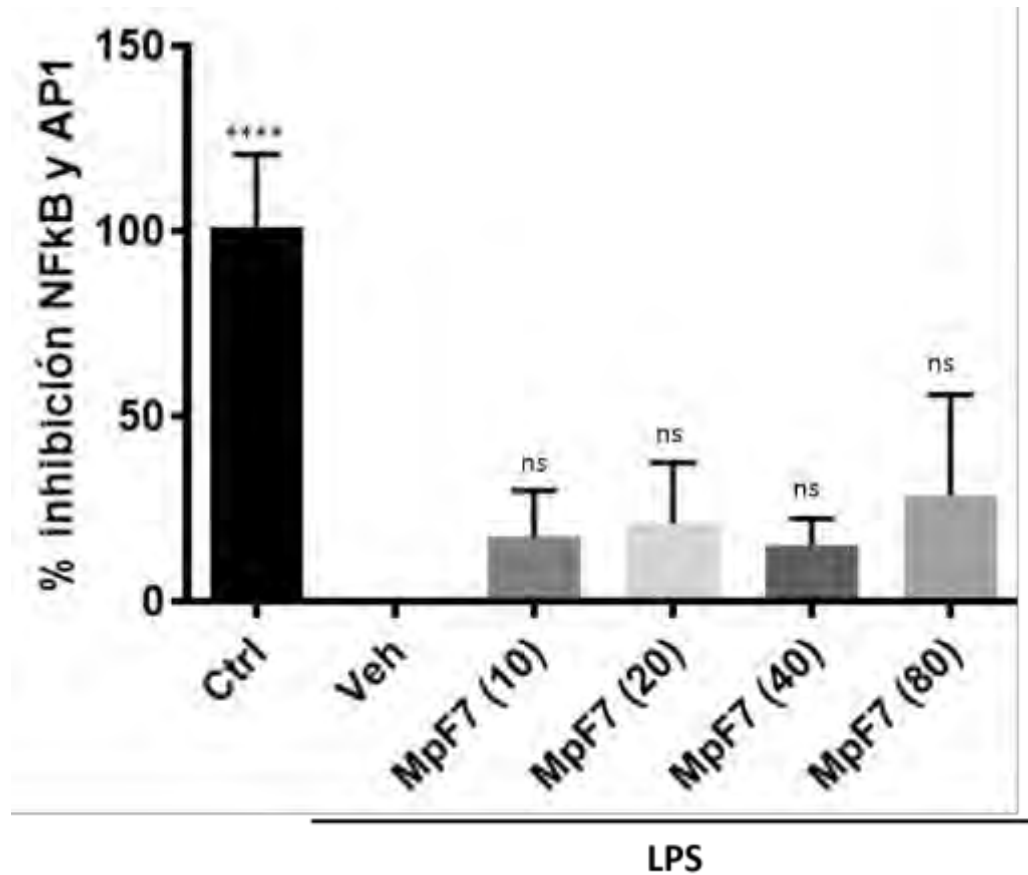


Fig. 6. Efecto anti-inflamatorio de la fracción 7 de *M. parviflora* (MpF7) en macrófagos RAW-Blue. Porcentaje de inhibición de NFkB y AP-1 en macrófagos RAW-Blue, utilizando diferentes concentraciones (10, 20, 40, 80 µg/ml) de la fracción 7 de *M. parviflora*. Vehículo: tween 20 con una concentración final no mayor a 0.0024% . (n=5). ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey ($p = \alpha < 0.05$). Significancia respecto a LPS + Veh. (ns= no significativo).

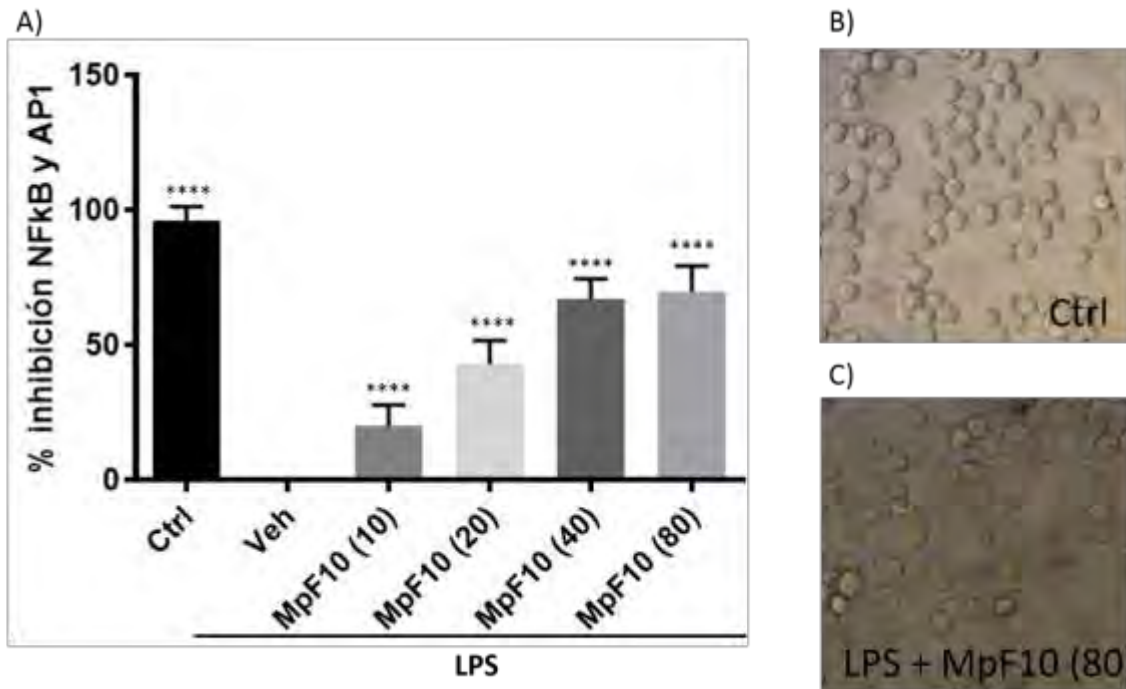


Fig. 7. Efecto anti-inflamatorio de la fracción 10 de *M. parviflora* (MpF10) en macrófagos RAW-Blue. A) Porcentaje de inhibición de NFkB y AP-1 en macrófagos RAW-Blue, utilizando diferentes concentraciones (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$) de la fracción 10 de *M. parviflora*. Vehículo: tween 20 con una concentración final no mayor a 0.0024 %. ($n=5$). ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey ($p = \acute{o} < 0.05$). Significancia respecto a LPS + Veh. B) Células sin ningún tratamiento (ctrl). C) Células con LPS más MpF10 a 80 $\mu\text{g/ml}$.

Finalmente, para el caso del compuesto aislado (Daucosterol, MpDau), se decidió probar su actividad a concentraciones no mayores de 80 $\mu\text{g/ml}$ debido a que se trata de un compuesto puro. Las concentraciones evaluadas fueron de 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$, con lo que se observó un efecto inhibitorio de la actividad de NFkB y AP-1 dependiente de la concentración, donde la mínima observada, a 2.5 $\mu\text{g/ml}$, fue de 17.95 % y la máxima, a 40 $\mu\text{g/ml}$, de 47.36 % (Fig. 8A). Cabe destacar que a la concentración más alta (80 $\mu\text{g/ml}$) pudo observarse al microscopio daño en muchas de las células (datos no mostrados), no así en las tratadas a concentraciones igual o menores a 40 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 8C y D). Aunado a esto, pudo observarse que el efecto de la fracción aumentaba casi 3 veces al usar la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con la de 10 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se decidió evaluar también a concentraciones intermedias (12.5, 15 y 17.5 $\mu\text{g/ml}$), donde pudo observarse un aumento gradual en el efecto (Fig. 8B). Además, las concentraciones de 15 y 17.5 $\mu\text{g/ml}$ resultaron tener una actividad ligeramente mayor que a 20 $\mu\text{g/ml}$.

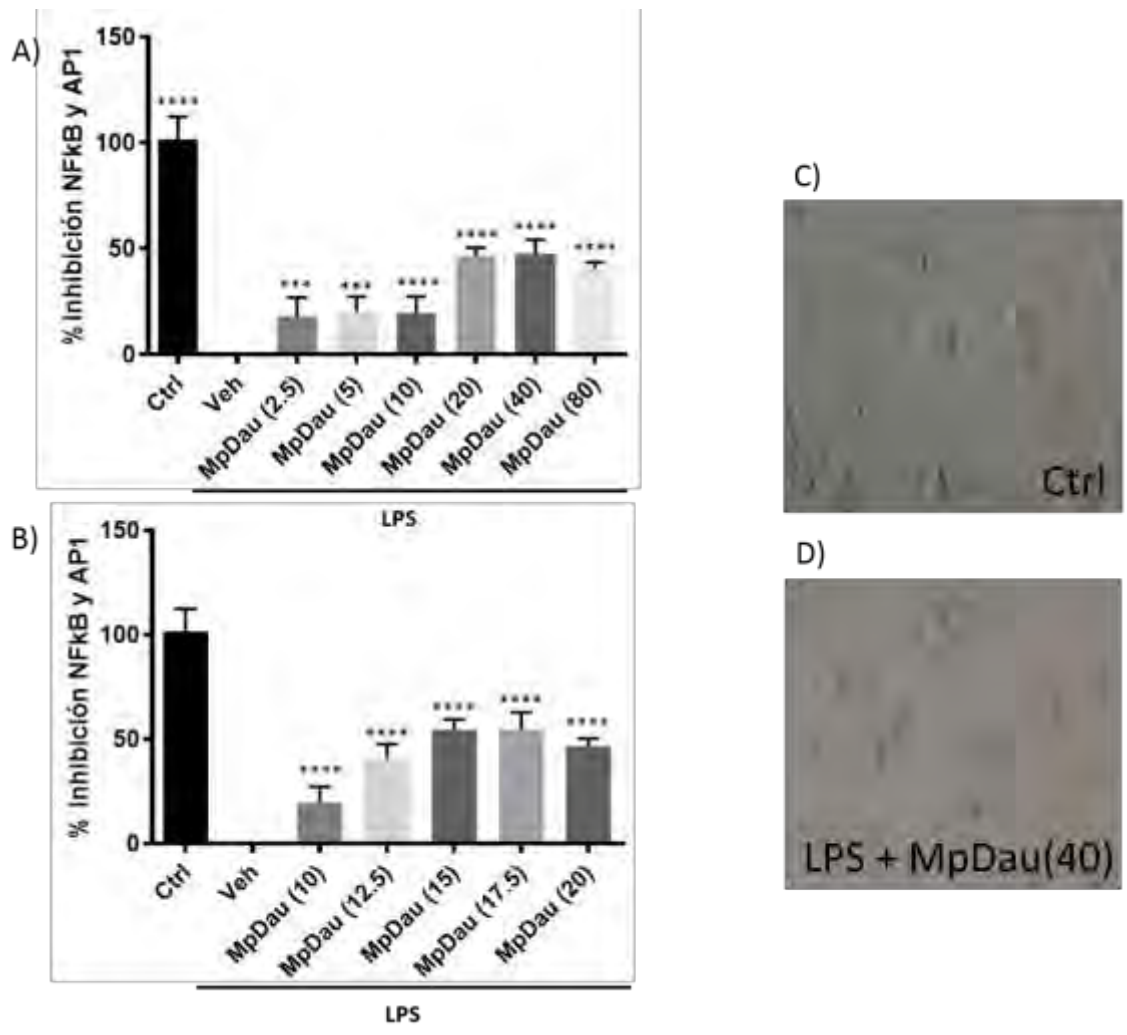


Fig. 8. Efecto anti-inflamatorio de un compuesto aislado de *M. parviflora* (MpDau) en macrófagos RAW-Blue. A) y B) Porcentaje de inhibición de NFkB y AP-1 en macrófagos RAW-Blue, utilizando diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 40, 80 µg/ml) de un compuesto aislado de *M. parviflora*. Vehículo: tween 20 con una concentración final no mayor a 0.0024%. ($n=5$). ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey ($p = \acute{o} < 0.05$). Significancia respecto a LPS + Veh. C) Células sin ningún tratamiento (ctrl). D) Células con LPS más MpDau a 40 µg/ml.

7.2.- Efecto farmacológico de MpF10 en un modelo murino de neuroinflamación.

La fracción MpF10 y el compuesto aislado MpDau, por su mayor actividad anti-inflamatoria, fueron seleccionadas para evaluarse en un modelo murino de neuroinflamación inducida con LPS, el cual ha sido relacionado con procesos similares a los desarrollados durante la EA (Lee, J. 2008; Lykhmus, O. 2015).

La inducción de neuroinflamación se llevó a cabo en ratones ICR, para lo cual se les inyectó durante 7 días 125 µg/kg de LPS de forma i.p y posteriormente los diferentes tratamientos (MpHA, MpD, MpF10, MpDau, Indo) vía oral (v.o.) (Fig. 1A). A los animales se les realizó la prueba de laberinto acuático de Morris (LAM) (Fig. 1C) para evaluar memoria y aprendizaje; y después de su sacrificio, se evaluó astrogliosis reactiva en hipocampo por inmunolocalización.

7.2.1.- Evaluación de memoria y aprendizaje en Laberinto acuático de Morris (LAM).

Los animales fueron sometidos a la prueba de LAM, la cual se divide en dos etapas, el aprendizaje (o adquisición) y la prueba de memoria (Fig. 1A). Para la primera etapa los animales recibieron entrenamiento diario durante 5 días consecutivos, durante los cuales se les colocó desde 4 puntos diferentes de inicio (N, O, S, E) cada día y se les dejó explorar libremente hasta encontrar la plataforma de escape (Latencia a la plataforma), donde observamos que el grupo control tuvo un comportamiento que refleja un proceso de aprendizaje íntegro, ya que a través de los 5 días disminuyó de forma gradual el tiempo de latencia a la plataforma (Fig. 9 A), no así los ratones inyectados con LPS, los cuales mantuvieron tiempos de latencia mayores (Fig. 9 A). Lo anterior se confirmó al calcular el área bajo la curva de éste parámetro para cada grupo (Fig. 10), el cual además, reflejó que este efecto fue contrarrestado por la administración de MpF10 a las dosis de 5 y 10 mg/kg; y de MpHA a 50 mg/kg.

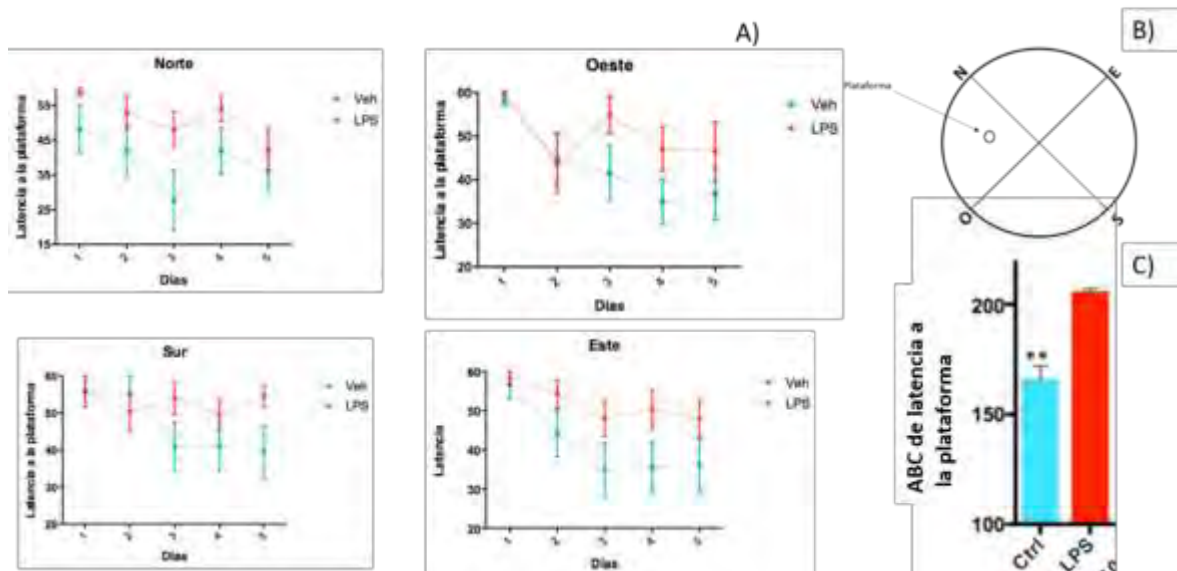


Fig. 9. Aprendizaje en ratones administrados con LPS como modelo de neuroinflamación. A) Curva temporal de latencia a la plataforma tomando como punto de partida los cuadrantes Este, Norte, Sur y Oeste. B) Esquema de Laberinto Acuático de Morris. C) Área bajo la curva de graficas en A. ($n=12$). ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni ($p = \delta < 0.05$). Significancia respecto a LPS.

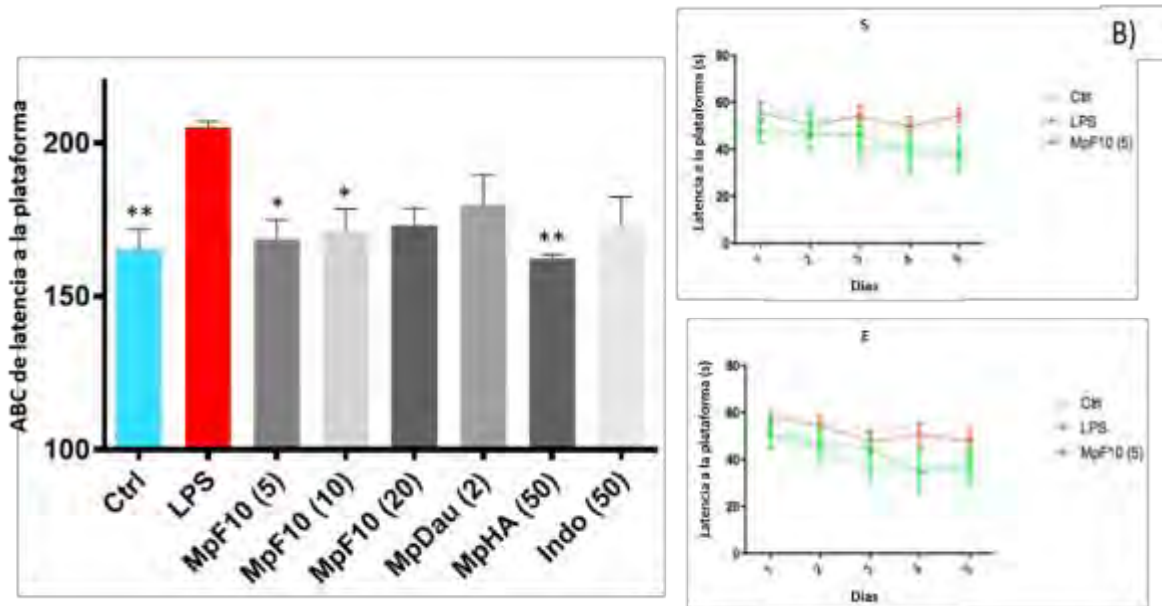


Fig. 10. Aprendizaje en ratones con neuroinflamación tratados con derivados de *M. parviflora*. A) Área bajo la curva (ABC) de latencia a la plataforma de ratones administrados con diferentes tratamientos (fracción 10 –MpF10-, compuesto aislado –MpDau-; Extracto hidro-alcohólico –MpHA-; Indometacina –Indo-) ($n=12$). B) Efecto de MpF10 en el aprendizaje. Curva temporal de Latencia a la plataforma tomando como punto de partida los cuadrantes Sur y Este. ($n=12$). ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni ($p = \delta < 0.05$). Significancia respecto a LPS.

Dos días después del periodo de aprendizaje, se llevó a cabo la prueba de memoria, durante la cual, la plataforma es retirada y el ratón explora la tina en busca de ella. A partir de esta prueba se midieron dos parámetros principalmente: 1) la **latencia a la zona de la plataforma** (tiempo en llegar por primera vez a la zona donde se encontraba la plataforma) y 2) la **frecuencia de visita a la zona de la plataforma** (número de visitas). Respecto al primer parámetro, observamos de forma similar al entrenamiento, que los ratones inyectados con LPS tardaban más en llegar a la zona de la plataforma y que esto se revertía mediante la administración de MpF10 a 5 mg/kg (Fig. 11A). Por otro lado, para el segundo parámetro medido, se observó una gran disminución en la frecuencia con la que visitaban la zona de la plataforma los ratones con daño inducido en comparación con los animales control, y que ésta se recuperaba con la administración de MpF10 a 5 mg/kg, y como ya se había observado anteriormente, con MpHA a 50 mg/kg y el AINEs Indometacina (Indo) a 50 mg/kg (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación) (Fig. 11 B).

De acuerdo con lo anterior, al revisar el patrón de nado de los animales puede observarse que el de los ratones con daño es más errático, y que los que recibieron el tratamiento con MpF10, MpHA e Indo presentan un nado mucho más dirigido (Fig. 12D).

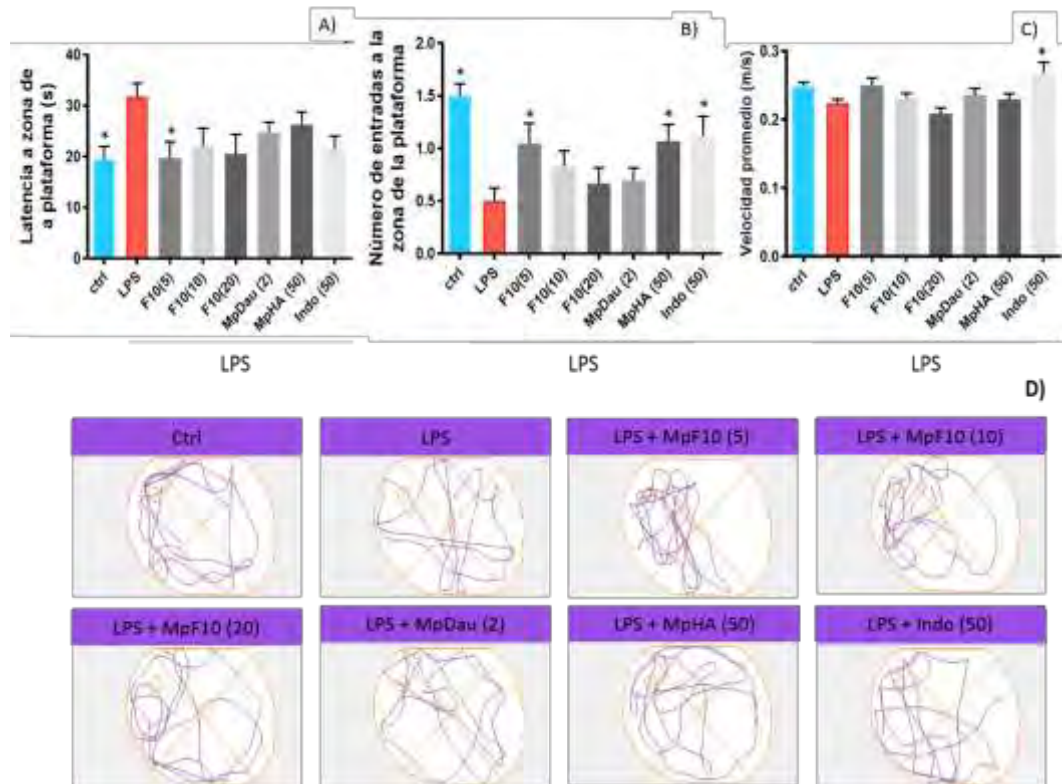


Fig. 11. Memoria en ratones con neuroinflamación tratados con derivados de *M. parviflora*. A). Latencia de entrada a la zona de la plataforma, B) Número de entradas a la zona de la plataforma, C) velocidad promedio y D) trayecto recorrido (de ratón representativo) durante la prueba de memoria (LAM) en ratones administrados con diferentes tratamientos (fracción 10 –MpF10-, compuesto aislado –MpDau-; Extracto hidro-alcohólico –MpHA-; Indometacina –Indo-) (n=12). ANOVA de una vía con post-prueba de Bonferroni ($p = \acute{o} < 0.05$). Significancia respecto a LPS.

Finalmente, es importante mencionar que la velocidad de nado de los animales en los diferentes grupos no mostró una diferencia significativa (con excepción del grupo que recibió Indo), lo que indica que el efecto visto en los parámetros ya mencionados no se debe a una mayor actividad motriz (Fig. 11C) y refleja adecuadamente los proceso de aprendizaje y memoria.

7.2.2.- Astrogliosis reactiva en hipocampo

Posterior a la prueba de LAM, la mitad de animales de cada grupo fue perfundido y se obtuvo el cerebro para determinar el grado de astrogliosis reactiva a través de tinciones de inmunohistoquímica contra GFAP, en donde se encontró que la administración de LPS lleva a un aumento en ésta en comparación con los controles, y que tal efecto es revertido por la posterior administración de MpF10 (5, 10, 20 mg/kg), MpDau (2 mg/kg), MpHA (50 mg/kg) e Indo (50 mg/kg) (Fig. 12).

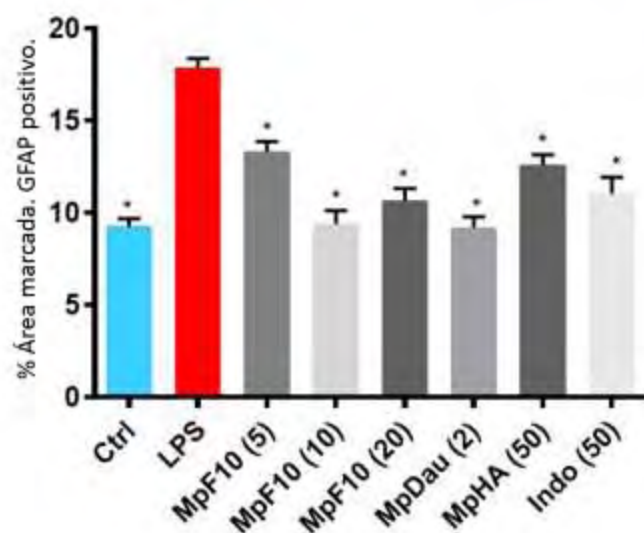
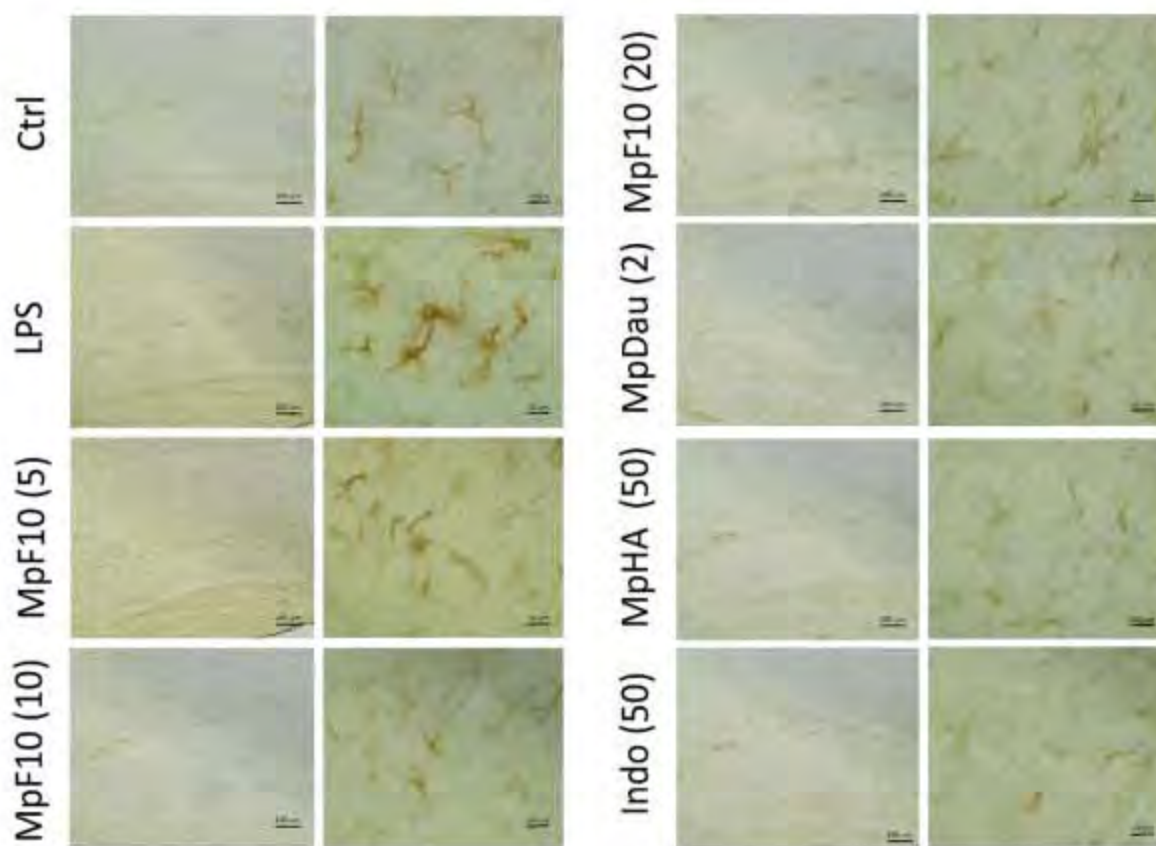


Fig. 12. Astrogliosis reactiva en animales con neuroinflamación tratados con derivados de *M. parviflora*. A) Fotos representativas de inmunotinción contra GFAP en hipocampo de cortes sagitales de cerebro. Barra de escala = 100 ó 10 μ m según lo indicado. B) Cuantificación semicuantitativa de GFAP, expresado como porcentaje de área marcada. ANOVA de una vía con postprueba Bonferroni ($p = \text{ó} < 0.05$). Significancia respecto a LPS.

8.- DISCUSIÓN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento cuyo cuadro clínico suele incluir afasia, problemas visuales, simultanagnosia, ataxia ocular; alteraciones en el comportamiento y varios síntomas neuropsiquiátricos, como ansiedad, depresión y pérdida de la capacidad de aprendizaje y memoria (Cummings, 2000; Duthey, 2013); esto lleva a los pacientes que la padecen a tener problemas al realizar sus actividades diarias, llevándolos a convertirse en personas dependientes de alguien más y afectando gravemente su calidad de vida. La EA es el tipo más común de demencia, con una proporción a nivel global, que va del 50% al 75% del total de demencias (Duthey, 2013); a su vez la demencia, es un síndrome con una prevalencia e incidencia muy alta, con un estimado de 46.8 millones de casos a nivel mundial en 2015 (World Alzheimer Report, 2015), lo que convierte a este padecimiento en asunto prioritario para los sistemas de salud en todo el mundo.

A pesar de lo anterior, hasta el momento no existe ningún medicamento que frene o revierta el desarrollo de la enfermedad, y su tratamiento se limita a fármacos enfocados en retrasar los síntomas presentes; ejemplo de esto son los inhibidores de acetil-colinesterasa, los cuales al compensar el déficit colinérgico característico de la enfermedad, logran temporalmente una mejoría en procesos como el aprendizaje y la memoria, pero pierden su funcionalidad en etapas tardías.

La etiología de la EA, no es bien conocida, sin embargo, se sabe que existen factores de riesgo importantes entre los que destacan aquellos que conllevan un proceso inflamatorio y pro-oxidante, como son el envejecimiento, traumatismos cerebrales, infecciones sistémicas, obesidad, actividad física reducida, y enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión (Alzheimer's association, 2014; Lim, 2013; Matrone 2015; Dosunmu, 2007). Esto ha llevado a considerar que la inflamación juega un papel muy importante durante el proceso de iniciación de la cascada neurodegenerativa presente en dicha enfermedad, proponiéndose que el proceso inflamatorio podría originarse inicialmente a nivel periférico y a través de un daño en la función de la BHE, llegar al SNC, induciendo y/o exacerbando el desarrollo de la enfermedad. Esto además, ha sido apoyado por evidencia experimental en diversas ocasiones (Lim, 2015; Lykhmus, 2015; Lee, 2008; Sheng, 2003; Weberpals, 2009; Elysse, 2014; Carnevale, 2012; Freude, 2009; Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

Sumado a esto, existen evidencias epidemiológicas de que la administración de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) durante periodos prolongados (2-3 años) en fases tempranas de la enfermedad, disminuyen la incidencia de ésta en pacientes asintomáticos (Breitner, 2011). Desafortunadamente, debido a su mecanismo de acción, el consumo crónico de estos fármacos se ha asociado a efectos no deseados como son gastropatías (Lazzaroni, 2004) y eventos vasculares

(Kearney, 2006); lo que justifica la búsqueda de agentes terapéuticos con propiedades anti-inflamatorias que potencialmente tuvieran un efecto benéfico al usarse como tratamiento para la EA.

Las plantas han demostrado históricamente su valor como fuente de moléculas con potencial terapéutico para diversos padecimientos, gracias principalmente a su amplia diversidad química y a la información etnofarmacológica disponible, que sirve como guía para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos.

México es un país que cuenta con una gran variedad florística que forma parte del acervo etnomédico-cultural. Un ejemplo es *Malva (M.) parviflora*, una planta herbácea de uso extendido por sus propiedades anti-inflamatorias y analgésicas sin aparentes efectos secundarios (Argueta, 1994); además, existen evidencias experimentales que confirman que posee metabolitos con actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora entre otras (Bouriche, 2011; Shale, 2005; Aslam, 2014; Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

Por lo anterior, en la primera parte de este trabajo, se realizó la selección biodirigida de una fracción de *Malva parviflora* con propiedades anti-inflamatorias; proceso que se dividió en dos etapas utilizando en cada una un modelo diferente. Para la primera etapa se indujo una inflamación aguda con TPA de forma tópica en las orejas de ratones ICR, donde las fracciones con mayor actividad resultaron la MpF7 y la MpF10, además de un compuesto aislado identificado como Daucosterol. Posteriormente, como segundo ensayo se utilizó un modelo *in-vitro* con macrófagos murinos RAW-Blue, el cual permitió por un lado, confirmar el efecto anti-inflamatorio, y por otro, evaluar diferentes concentraciones de cada tratamiento en forma rápida, posibilitando el cálculo de una posible ventana terapéutica (para cada tratamiento) en un modelo murino. Como resultado de estos ensayos se observó que, a diferencia de la MpF10, la MpF7 no mostró actividad a las dosis evaluadas, lo cual posiblemente se deba a que el o los mecanismos a través del cual ejerce su efecto en el modelo de edema auricular, no involucre cambios significativos en la actividad de los factores de transcripción NFκ-B y AP-1, parámetro medido en el modelo *in-vitro* utilizado.

Por otro lado, en este mismo modelo *in-vitro* pudieron observarse comportamientos interesantes en los porcentajes de inhibición de NFκB y AP-1 alcanzados por los diferentes tratamientos a ciertas concentraciones; por ejemplo el MpHA, el cual ha demostrado anteriormente poseer actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora en un modelo murino de la EA (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación), alcanzó únicamente un 28.88% de inhibición a la concentración de 100 µg/ml, mientras que el MpD a la misma concentración logró un 72.79 %; lo cual recapitula el mejor efecto observado en el modelo de edema auricular. Sumado a esto, observamos que la MpF10 alcanzó porcentajes

cercanos al 70 % de inhibición a concentraciones (40 µg/ml y 80 µg/ml) inferiores a las observadas con el MpD. Finalmente, para el caso del compuesto aislado (MpDau), el efecto máximo observado fue de 54.59 % a la concentración de 17.5 µg/ml, lo cual nos permite proponer que la mezcla de compuestos presente en MpF10 representa un mejor tratamiento como anti-inflamatorio que un compuesto único (MpDau), probablemente debido a que contiene más de un componente activo, cada uno con diferente mecanismo de acción, que al sumarse llevan a un mejor efecto global.

Una vez habiendo seleccionado a la MpF10 como la fracción con mejor efecto anti-inflamatorio; ésta, junto con el compuesto aislado (MpDau) se evaluaron en un modelo *in-vivo* de neuroinflamación. Para esto, ratones ICR fueron inyectados de forma intraperitoneal (i.p.) con LPS, llevándolos a desarrollar déficit cognitivo (reflejado en procesos de memoria y aprendizaje alterados) y neuroinflamación (estimado por el nivel de astrogliosis reactiva). Esta estrategia nos permitió mimetizar padecimientos de origen sistémico que implican un proceso inflamatorio, como son infecciones, obesidad, actividad física reducida, y enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión, todos factores de riesgo para el padecimiento de la EA (Alzheimer's association, 2014; Lim, 2013; Matrone 2015; Dosunmu, 2007). Posterior a las inyecciones con LPS, los ratones recibieron por v.o. los diferentes tratamientos, incluyendo el compuesto MpDau a 2 µg/kg y tres dosis de MpF10 (5, 10, 20 µg/kg). Los resultados indican que, aunque todos los tratamientos llevaron a la disminución de la astrogliosis reactiva, no todos condujeron a una mejora significativa en la memoria y el aprendizaje.

Para el caso de la memoria, los tratamientos con actividad fueron la MpF10 a 5 y 10 µg/kg y el MpHA a 50 µg/kg; mientras que, para el aprendizaje, el único que llevó a una mejora en los dos parámetros medidos (latencia a la plataforma y número de entradas) fue la MpF10 a 5 µg/kg. Los resultados para el MpHA concuerdan con lo observado anteriormente en el laboratorio, donde ratones modelo de la EA fueron tratados a la misma dosis y al realizar la prueba de LAM, se observó que, aunque los animales sí parecían estar aprendiendo, no lograban consolidar esta información en su memoria a largo plazo (Jiménez-Ferrer, manuscrito en preparación).

Por otro lado, en referencia al efecto de la MpF10 a sus diferentes dosis, pareciera que la de mejor efecto en la prueba de LAM es la dosis menor (5 µg/kg), no así, en los niveles de astrogliosis reactiva donde si bien si disminuye significativamente, tiende a tener un menor efecto que a dosis más altas. Lo anterior podría deberse a que la MpF10 representa una mezcla de compuestos, donde cada uno tendrá un efecto específico dado por cierto mecanismo y una ventana terapéutica, es decir un rango de concentraciones séricas (máximo y mínimo) dentro de las cuales existe una elevada probabilidad de obtener la respuesta clínica deseada; y aunque las concentraciones relativas de cada

compuesto dentro de la fracción se conservan a cualquiera de las dosis, las concentraciones séricas de cada componente, podrían permanecer o no dentro de su ventana terapéutica, conservando o perdiendo su efecto específico, explicando cómo en ciertos parámetros medidos se observa un efecto y en otros no. En este contexto resultaría de gran importancia la identificación de los compuestos presentes en MpF10, lo que permitiría la modificación en las concentraciones relativas de los mismos en busca de que al administrar una dosis definida, cada uno se encuentre dentro de su rango terapéutico ideal.

De forma inicial, en este trabajo, ya se ha determinado la identidad de uno de los componentes de dicha fracción, el Daucosterol (MpDau), el cual fue evaluado de forma independiente en los mismos modelos que la MpF10 completa y mostró tener potencial farmacológico; lo que concuerda con lo anteriormente reportado para el mismo. El Daucosterol (también conocido como β -sitosterol β -D-glucósido) es un fitosterol presente en ciertas plantas, para el cual ya han sido reportados algunos efectos farmacológicos como son el de analgésico (Villaseñor, 2002), anti-inflamatorio (Lee, 2007) y neuroprotector (Li-hua, 2015) entre varios otros; lo que respalda su actividad observada durante este proyecto. Sin embargo, a pesar de que se confirmó su actividad biológica, observamos que, si bien este compuesto aislado obtuvo una importante inhibición de NF- κ B y AP-1 en los ensayos *in-vitro* (máximo observado: 54.59%) a concentraciones bastante bajas (17.5 μ g/ml), no logró mostrar un efecto mayor al observado con la MpF10. Por otro lado, durante la evaluación *in-vivo*, MpDau no mostró de forma significativa efecto alguno mas que en la disminución de la astrogliosis reactiva, llevándonos de nuevo a la conclusión de que la MpF10 tiene más de un compuesto biológicamente activo, entre los que se encuentra el Daucosterol y algunos otros, que podrían estar ejerciendo su efecto por vías diferentes y/o ayudando a la biodisponibilidad del anterior.

9.- CONCLUSIONES.

La "fracción 10 de *M. parviflora*" (MpF10) está constituida por una mezcla de compuestos, donde uno o varios de ellos poseen propiedades anti-inflamatorias; esto determinado mediante un modelo de edema auricular y en macrófagos *in-vitro*.

La MpF10 tiene actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora en un modelo murino de neuroinflamación inducido con LPS intraperitoneal, principalmente a la dosis de 5µg/kg.

La MpF10 contiene Daucoesterol, un compuesto con efecto anti-inflamatorio y neuroprotector anteriormente reportado.

El efecto anti-inflamatorio de MpF10 observado en un modelo de edema auricular o en uno de macrófagos *in-vitro*; así como el neuroprotector en un modelo murino de neuroinflamación no es equivalente al visto con la administración de Daucoesterol a las dosis o concentraciones evaluadas, lo que sugiere que contiene más compuestos biológicamente activos.

10.- PERSPECTIVAS.

Confirmar la recapitulación del efecto neuroprotector observado anteriormente con la administración del MpHA en un modelo de la EA, por la MpF10.

Identificar los compuestos presentes en MpF10.

Proponer y evaluar diferentes concentraciones relativas de los compuestos hallados en MpF10 para determinar la composición con mejor efecto neuroprotector en un modelo murino de la EA.

Evaluar la toxicidad de los compuestos encontrados en MpF10.

Proponer, mediante el uso de diferentes estrategias, un mecanismo de acción a través del cual *M. parviflora* ejerce su efecto.

11.- BIBLIOGRAFÍA CITADA.

1. Armstrong R. *The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. 2009. *Folia Neuropathol.* 47(4):289-99.
2. Armstrong R. *What causes Alzheimer's disease?* *Folia Neuropathol.* 2013. 51 (3): 169-188.
3. Argueta A, Cano L, Rodarte M. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México, D.F.: Instituto Nacional Indigenista.
4. Aslam M, Sial A. *Neuroprotective Effect of Ethanol Extract of Leaves of Malva parviflora against Amyloid- β - (A β -) Mediated Alzheimer's Disease*. 2014. *International Scholarly Research Notices.* 156976.
5. Alzheimer's Association. *Alzheimer's Association Report 2014. Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimer's & Dementia.* 2014. 10: e47-e92.
6. Bertram L, Tanzi R. (2012). *Progress in Molecular Biology and Translational.* Science. DOI: 10.1016/B978-0-12-385883-2.00008-4. Pags: 84-85.
7. Bouic P, Etsebeth S, Liebenberg R, Albrecht C, Pegel K, Van Jaarsveld P. *beta-Sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination*. *Int J Immunopharmacol.*1996. 18; 12: 693-700.
8. Bouriche M, Meziti H, Senator A, Arnhold J. *Anti-inflammatory, free radical-scavenging, and metal-chelating activities of Malva parviflora*. *Pharmaceutical Biology.* 2011; 49(9): 942–946.
9. Breitner J, Baker L, Montine T, Meinert C, Lyketsos C, Ashe K, Brandt J, Craft S, Evans D, Green R, Ismail S, Martin B, Mullan M, Sabbagh M, Tariot P. *Extended results of the Alzheimer disease anti-inflammatory prevention trial (ADAPT)*. *Alzheimer's Dement.* 2011. 7(4): 402–411.
10. Cárdenas-Aguayo M, Gómez-Virgilio L, DeRosa S, Meraz-Ríos M. *The Role of Tau Oligomers in the Onset of Alzheimer's Disease Neuropathology*. *Chem. Neurosci.* 2014, 5, 1178–1191.
11. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai C, Sun S, Lee M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong C. *A non-transgenic mouse model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD Mouse)*. 2013. *Mol Neurobiol.* 47(2):711–25.
12. Cunningham C, Martinez-Cerdeno V, Noctor S. *Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex*. 2013. *J. Neurosci.* 33, 4216–4233.
13. Cummings J. *Cognitive and Behavioral Heterogeneity in Alzheimer's Disease: Seeking the Neurobiological Basis*. *Neurobiology of Aging.* 2000. 21(6):845-61.
14. Cunningham C, *Microglia and Neurodegeneration: The Role of Systemic Inflammation*. *GLIA.* 2013. 61:71–90.
15. Department of Health and Human Services. *Food Labeling; Health Claim; Phytosterols and Risk of Coronary Heart Disease; Proposed Rule by Food and Drug Administration*. Federal Register. 2010; 75:76526-71.
16. DeKosky S, Ikonomic M, Styren S, Beckett L, Wisniewski S, Bennett D, Cochran E, Kordower J, Mufson E. *Up-regulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment*. *Ann Neurol.* 2002. 51:145–155.
17. Dosunmu R, Wu J, Basha M, Zawia N. *Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease*. 2007. *Expert Rev Neurother.* 7(7):887-900.
18. Duthey B (2013) *Background paper 6.11 Alzheimer disease and other dementias*.
19. Espinosa F, Sarukhán J. (1997). *Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones*. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
20. Farhan H, Rammal H, Hijazi A, Badran B. *Preliminary phytochemical screening and extraction of polyphenol from stems and leaves of a lebanese plant Malva parviflora*. *Int J Curr Pharm Res.*2012.4: 55-59.
21. Gutiérrez-Robledo L, Arrieta-Cruz I. *Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan*. *Gac Med Mex.* 2015. 151(5):667-73.
- 22.
23. Hall A, Roberson E. *Mouse models of Alzheimer's disease*. *Brain Research Bulletin* 88. 2012: 3– 12.
24. Koehling T, Lim F, Hernandez F, Avila J. *Neuronal Models for Studying Tau Pathology*. *International Journal of Alzheimer's Disease.* 2010, 528474.
25. Lykhmus O, Voytenko L, Koval L, Mykhalskiy S, Kholin V, Peschana K. *a7 Nicotinicacetylcholinereceptor-specificantibodyinduces inflammation andamyloid b42 accumulationinthemousebrainto impair memory*. 2015. *PLoS One* 10.1371.

26. Harris J. (2012). *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. (Subcellular Biochemistry 65)*. Springer. DOI 10.1007/978-94-007-5416-4_14. Pags: 329-330.
27. Kearney P, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson J, Patrono C. *Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials*. *BMJ* 2006; 332:1302.
28. Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C. *Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice*. 2012. *J Neuroinflammation*. 9:151.
29. Lagunas H. Tesis de maestría *Evaluación química y farmacológica de los extractos de malva parviflora silvestre y cultivada sobre la inflamación cardiovascular asociada a hipertensión*. Centro De Desarrollo De Productos Bióticos Instituto Politecnico Nacional. 2009.
30. Lazzaroni M, Bianchi G. *Gastrointestinal side-effects of traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and new formulations*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004. 2:48-58.
31. Lee J, Lee Y, Yuk D, Choi D, Ban S, Oh K, Hong J. *Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation*. 2008. *J Neuroinflammation*. 29; 5:37.
32. Lee J, Park J, Jung H, Kim J, Kang S. *Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice*. *Vaccine*. 2007; 25: 3834-40.
33. Lim S, Rodriguez-Ortiz C, Kitazawa M. *Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease*. 2015. *Microbes and Infection*. 17: 549–556.
34. Matrone C, Djelloul M, Tagliatalata G, Perrone L. *Inflammatory risk factors and pathologies promoting Alzheimer's disease progression: is RAGE the key?* 2015. *Histol Histopathol*. 30(2):125-39.
35. Oakley H, Cole S, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. *Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation*. *J Neurosci*. 2006 4; 26(40):10129-40.
36. Perez-Gutierrez R. *Evaluation of Hypoglycemic Activity of the Leaves of Malva Parviflora in Streptozotocin-induced Diabetic Rats*. *Food & Function*. 2012. 3(4):420-7.
37. Pintado C, Gavilan M, Gavilan E, Garcia-Cuervo L, Gutierrez A, Vitorica J. *Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus*. 2012. *J Neuroinflammation*. 9 (1):87.
38. Quiroz-Baez R, Rojas E, Arias C. *Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of α -, β - and γ -secretase expression*. *Neurochemistry International*. 2009. 55, 7: 662–670.
39. Santana I, Farinha F, Freitas S, Rodrigues V, Carvalho A. *The Epidemiology of Dementia and Alzheimer Disease in Portugal: Estimations of Prevalence and Treatment-Costs*. 2015. *Acta Med Port*. 28(2):182-8.
40. Shale T, Stirk W, van Staden J. *Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of Malva parviflora and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 96: 325–330.
41. Sheng J. *Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid β peptide in APP^{swe} transgenic mice*. 2003. *Neurobiol. Dis*. 14, 133–145.
42. Terry A, Buccafusco J. *The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease- Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development*. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics (JPET)*. 2003. 306:821–827.
43. The taxonomicon. Universal Taxonomic Services.
<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx>. Fecha de acceso: 10-05-2015.
44. Thériault P, ElAli A, Rivest S. *The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease*. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2015. 7:41.
45. Wang J, Wu F, Shi C. *Substitution of membrane cholesterol with β -sitosterol promotes nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein*. *Neuroscience*. 2013. 5; 247: 227-33.
46. Wang X, Bunkers G, Walters M, Thoma R. *Purification and Characterization of Three Antifungal Proteins from Cheeseweed (Malva parviflora)*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001. 282: 1224–1228.
47. Weberpals M. *NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits*. 2009. *J. Neurosci*. 29, 14177–14184.

48. Zeng Y, Zhang J, Zhu Y, Zhang J, Shen H, Lu J, Pan X, Lin N, Dai X, Zhou M, Chen X. *Tripchlorolide improves cognitive deficits by reducing amyloid β and upregulating synapse-related proteins in a transgenic model of Alzheimer's Disease*. J Neurochem. 2015. 133(1):38-52.
49. Zhu Z, Yan J, Jiang W, Yao X, Chen J, Chen L, Li C, Hu L, Jiang H, Shen X. *Arctigenin Effectively Ameliorates Memory Impairment in Alzheimer's Disease Model Mice Targeting Both β -Amyloid Production and Clearance*. The Journal of Neuroscience. 2013. 33(32):13138 –13149.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco:

En primer lugar a la Dra. Leonor Pérez Martínez por aceptar ser mi tutora, permitirme formar parte de su grupo de investigación y apoyarme durante todo el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Maribel L. Herrera Ruiz y al Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer por permitirme llevar a cabo parte del proyecto en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS)- IMSS. Por asesorarme durante el desarrollo del proyecto y por formar parte del comité tutorial.

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

A la Biol. Gabriela Vargas-Villa por su ayuda durante el fraccionamiento del MpD y la evaluación en el modelo de edema auricular.

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

A Oswaldo López Gutiérrez por el apoyo técnico brindado.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza, la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes, el Dr. Humberto Lanz Mendoza, la Dra. Magdalena Guerra Crespo y la Dra. Lidia Riaño Umbarila, por formar parte del comité revisor de tesis.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo y patrocinio (Beca CONACYT Nacional. CVU: 663285).

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por el apoyo económico complementario para la realización de estudios de maestría y doctorado en ciencias en el área de la salud (Matricula: 99187271)

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

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

A Arturo Pérez, René, Jonathan Orduño, y al demás personal técnico de los laboratorios y bioterio del CIBIS por el apoyo brindado.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) por el apoyo técnico con el equipo Zeiss Axioskop de EpiFluorescencia, en especial a la Q.F.B. Xochitl Alvarado Affantranger.

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

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA203416, PAPIIT IN213316 Y PAPIIT IN212316) por el financiamiento otorgado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 155290) por el financiamiento otorgado.

Al Fondo de Investigación en Salud-IMSS (FIS/IMSS/PROT/G11/988) por el financiamiento otorgado.

A la Biol. Elisa Medrano, la Dra. Martha Pedraza, la M. en C. Sol Díaz y a todos mis demás compañeros de laboratorio, tanto del consorcio de Inmunoneurobiología en el IBt, como del área de Farmacología en el CIBIS, quienes me apoyaron en diferentes etapas durante la maestría.

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

A mis amigos por estar conmigo y apoyarme. Por ayudarme a olvidar las cosas malas y hacer que la vida sea más bella.

A Leo por estar cada segundo a mi lado animándome y ayudando en cada aspecto posible. Por aguantar mis días malos y mis peores, pero principalmente por todo el amor que me da.

A mi familia por desearme lo mejor y apoyarme cada uno a su manera aunque no concuerden conmigo. Por ser un soporte que siempre está ahí, por enseñarme tantas cosas y sobre todo, por quererme desde siempre.

A mi madre por darme ese amor, apoyo y comprensión incondicional que solo una madre puede dar y que dura por siempre. Por darme tantas oportunidades en la vida, entre ellas estudiar; y por cada segundo que me dedicó, cada decisión que tomó pensando en mí, y cada sacrificio que pudo hacer por mi causa. Porque a ella le debo todo y gracias a ella soy esta persona.