



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

Centro de investigación en biotecnología

**“EFECTO DE *ESCAMONINA 1* Y *TIRIANTINA C*
SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA
Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD
NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A
Ipomoea tyrianthina”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A:

M. EN B. JOSÉ MANUEL CASTRO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE



CUERNAVACA, MORELOS

2019

LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADA EN

- El Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en el Laboratorio de Neurofarmacología, bajo la asesoría de la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte.
- El Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en el Laboratorio de Química Analítica Orgánica, bajo la asesoría del Dr. Ismael León Rivera.
- El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNyN) en el Laboratorio de Patología Experimental, bajo la asesoría de la Dra. Juana Villeda Hernández[†].



Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico a través de los proyectos de investigación (90268 y CB2011-168569) y de la beca de estudiantil de doctorado (43923).

Dedicatoria

A mis padres, *José Manuel Castro Márquez* y *Andrea García Flores*, por brindarme siempre su apoyo y confianza incondicional durante todos mis estudios.

A mi abuelo *Juan Manuel*, por ser mi modelo de inspiración y fortaleza, y brindarme sus consejos y apoyo.

A mis hermanas, *Andrea* y *Luz María* que siempre han sido mi motivación y apoyo, para seguir luchando en la vida.

A *Lucero, M. Carolina, Dra. Carmen* y *Francis* por brindarme su amistad, consejo y apoyo en todo momento.

A *la Dra. Juanita* por todo su apoyo, enseñanza y amistad.

Gracias a todos por ser parte de mi vida, apoyándome en los momentos buenos y los muchos malos.

Agradecimiento

A la Dra. María del Carmen Gutiérrez y la Téc. Lucero Valladares por su apoyo, por su apoyo y enseñanza durante la realización de este proyecto de tesis en el Laboratorio de Neurofarmacología.

Al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) y al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNyN) por su colaboración en la realización de esta tesis, bajo la asesoría del Dr. Ismael León Rivera y la Dra. Juana Villeda Hernández, respectivamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de los proyectos 90268 y CB2011-168569, y de la beca de posgrado 43923.

A los miembros del comité tutorial por siempre estar en total disposición, aconsejarme y ofrecerme su apoyo: Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, Dr. Ismael León Rivera, Dra. Maribel Herrera Ruíz, Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Al jurado evaluador para la obtención del título por total disposición: Dra. Gina Lorena Quirarte, Dra. Irene de la Concepción Perea Arango, Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, Dr. Ismael León Rivera, Dra. Maribel Herrera Ruíz, Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa.

Contenido

Índice de figuras	8
Índice de tablas.....	10
Abreviaturas	11
Resumen	13
Abstract	15
Capítulo 1 : Generalidades	17
1.1 Introducción	17
1.1.1 Plantas medicinales: fitoquímica y actividad biológica	18
1.1.2 Plantas con actividad neuroprotectora	20
1.1.3 Neuroprotección y neurodegeneración	23
1.2 Antecedentes	24
1.2.1 La familia Convolvulaceae: género <i>Ipomoea</i>	24
1.2.2 Las resinas glicosídicas	30
1.2.3 <i>Ipomoea tyrianthina</i> Lindley.....	35
1.3 Justificación.....	43
1.4 Hipótesis.....	43
1.5 Objetivo general	44
1.5.2 Objetivos particulares.....	44
1.6 Estrategia experimental general	44
Capítulo 2 : Purificación de los glicolípidos	45
2.1 Generalidades.....	45
2.2 Objetivo particular	46
2.3 Materiales y métodos	46
2.3.1 Material vegetal y extractos de raíz de <i>Ipomoea tyrianthina</i>	46
2.3.2 Obtención de las resinas glicosídicas	46
2.3.3 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas.....	48
2.4 Resultados.....	48
2.4.1 Escamonina 1	48
2.4.2 Tiriantina C	49
2.5 Discusión.....	53
2.6 Conclusiones	54
Capítulo 3 : Efecto de escamonina 1 y tirinatina C sobre el sistema GABAérgico.....	55
3.1 Sistema nervioso: generalidades y neurotransmisión GABAérgica	55

3.1.1	Sistema nervioso y neurotransmisión.....	55
3.1.2	Sistema de transmisión GABAérgica.....	58
3.1.3	Excitotoxicidad y la función GABAérgica	60
3.2	Objetivos particulares.....	61
3.3	Materiales y métodos	62
3.3.1	Animales	62
3.3.2	Evaluación farmacológica.....	62
3.3.3	Análisis estadístico.....	64
3.4	Resultados	65
3.4.1	Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la concentración de GABA.....	65
	endógeno liberado.	65
3.4.2	Efecto de la concentración de sodio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escamonina 1 y tiriantina C.	70
3.4.3	Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre la liberación de.....	74
	GABA endógeno en presencia de escamonina I y tiriantina C.	74
3.4.4	Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la actividad del transportador de GABA (GAT).	77
3.4.5	Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la actividad del receptor GABA _B	81
3.5	Discusión.....	85
3.6	Conclusiones	87
Capítulo 4 :	Actividad anticonvulsiva y neuroprotectora de escamonina 1 y tiriantina C.....	89
4.1	Neuroprotección.....	89
4.1.1	Evaluación de la actividad neuroprotectora	89
4.1.2	Evaluación de la actividad anticonvulsiva y modelos experimentales	90
4.1.3	Modelos químicos: inducción de convulsión con pentilentetrazol (PTZ)	92
4.2	Objetivos particulares.....	94
4.3	Materiales y métodos	95
4.3.1	Animales	95
4.3.2	Evaluación farmacológica.....	95
4.3.3	Análisis estadístico.....	100
4.4	Resultados	101
4.4.1	Evaluación farmacológica.....	101
4.5	Discusión.....	125
4.5.2	Actividad neuroprotectora.....	127
4.6	Conclusiones	129

Capítulo 5 : Discusión, conclusión y perspectivas finales	130
5.2 Conclusión.....	133
5.3 Perspectivas.....	133
Referencias	135
Anexos.....	146
A: Purificación de los glicolípidos.....	146
1. Preparación de extractos de raíz de <i>Ipomoea tyrianthina</i>	146
2. Obtención de las resinas glicosídicas.....	146
2.1 <i>Escamonina 1</i>	146
2.2 Tiriantina C	147
B: Diagrama de flujo de los ensayos de liberación.	148
C: Preparación del buffer Krebs-Ringer modificado (medios de incubación).....	149
1. Preparación de medios de incubación	149
D: Cuantificación de GABA	150
1. Derivatización y análisis cromatográfico de la muestra	150
E: Obtención y preparación de tejidos para histología.....	154
1. Obtención de los tejidos	154
2. Preparación de los tejidos para histología.....	154
2.1 Deshidratación y aclaramiento	154
2.2 Inclusión en parafina	154
2.3 Obtención de cortes histológicos	154
2.4 Silanización de portaobjetos	155
F: Técnica histológica	156
1. Desparafinado y rehidratación de muestras	156
2. Tinción de Hematoxilina – Eosina (HE).....	156
3. Tinción de Plata – Amino – Cúprico (Técnica modificada por Anthony Benkovic).....	156
4. Técnica inmunohistoquímica	157
Publicaciones.....	159

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de los glicolípidos aislados de las Convolvulaceas.	32
Figura 2. <i>Ipomoea tyrianthina</i> (www.classicnatureprints.com; Hernández <i>et al.</i> , 1999; Carranza, 2007).....	35
Figura 3. Distribución de <i>Ipomoea tyrianthina</i> en México y Centroamérica.	150
Figura 4. Estructuras de compuestos aislados de <i>Ipomoea tyrianthina</i>	41
Figura 5. Diagrama experimental.....	44
Figura 6. Esquema de purificación de <i>escamonina I</i>	47
Figura 7. Esquema de purificación de <i>tiriantina C</i>	47
Figura 8. Escamonina 1.....	49
Figura 9. Obtención y fraccionamiento de la convolvulina.	50
Figura 10. Diagrama general de purificación de <i>tiriantina C</i>	51
Figura 11. Tiriantina C.....	52
Figura 12. Disposición y organización del sistema nervioso en distintos organismos	55
Figura 13. Células gliales: estructura y representación de algunas funciones	56
Figura 14. La neurona: características estructurales.	57
Figura 15. Modelo funcional, estructural y espacial de los tipos de sinapsis.	58
Figura 16. Sinapsis GABAérgica.	59
Figura 17. Liberación de GABA: condiciones control.	66
Figura 18. Liberación de GABA en medio basal en presencia de escamonina I.....	67
Figura 19. Liberación de GABA en medio basal en presencia de tiriantina C.	68
Figura 20. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación. ..	69
Figura 21. Efecto de la concentración de sodio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en condiciones control.	71
Figura 22. Efecto de la concentración de sodio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escammonina I y tiriantina C.	72
Figura 23. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación en presencia y ausencia de sodio extracelular.....	73
Figura 24. Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en condiciones control.	75
Figura 25. Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escamonina 1 y tiriantina C.....	76
Figura 26. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación en presencia y ausencia de sodio extracelular.....	77
Figura 27. Efecto de guvacina sobre la concentración de GABA endógeno liberado en condiciones control.....	79
Figura 28. Efecto de escamonina I y tiriantina C sobre la liberación de GABA endógeno en presencia y ausencia de guvacina.	80
Figura 29. Efecto de 2-hidroxisaclofén sobre la concentración de GABA endógeno liberado en condiciones control.	82
Figura 30. Efecto de escamonina I y tiriantina C sobre la liberación de GABA endógeno en presencia y ausencia de 2-hidroxisaclofén.	83
Figura 31. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación en presencia y ausencia de 2-hidroxisaclofén.	84
Figura 33. Modelo propuesto del sitio de la unión de PTZ en el receptor GABA _A	94
Figura 34. Esquema general de la evaluación del efecto neuroprotector.....	95

Figura 35. Esquema general de la técnica histológica.	99
Figura 36. Modelo de “PTZ-crónico” y evaluación farmacológica de escamonina 1 y tiriantina C.	104
Figura 37. Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre tejido cerebral de ratón.	106
Figura 38. Efecto de la administración aguda de <i>escamonina 1</i>	107
Figura 39. Efecto de la administración aguda de <i>tiriantina C</i>	108
Figura 40. Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre tejido cerebral en un modelo de inducción de daño con PTZ.	109
Figura 41. Efecto de la administración aguda de <i>PTZ</i>	110
Figura 42. Efecto neuroprotector de la administración aguda de <i>escamonina 1</i>	111
Figura 43. Efecto neuroprotector de la administración aguda de <i>tiriantina C</i>	112
Figura 44. Efecto de la administración subcrónica de escamonina 1 y tiriantina C sobre la integridad celular frente a la inducción de daño con PTZ en cerebrol de ratón.	114
Figura 45. Histología de los grupos control.	115
Figura 46. Efecto de la administración subcrónica de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i>	116
Figura 47. Efecto neuroprotector de la administración subcrónica de escamonina 1 y tiriantina C sobre la integridad celular frente a la inducción de daño con PTZ en cerebro de ratón.	117
Figura 48. Efecto de la administración subcrónica de escamonina 1 y tiriantina C sobre la integridad celular en corteza cerebral de ratón frente a la inducción de daño crónico en un modelo con PTZ.	118
Figura 49. Efecto neuroprotector de la administración subcrónica de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> en un modelo de daño crónico con PTZ.	119
Figura 50. Efecto neuroprotector de la administración aguda de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> contra la neurodegeneración.	120
Figura 51. Efecto de la administración aguda de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> sobre la activación glial.	121
Figura 52. Efecto de la administración aguda de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> sobre la viabilidad neuronal.	122
Figura 53. Efecto de la administración subcrónica de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> sobre la activación glial, viabilidad y degeneración neuronal.	123
Figura 54. Efecto de la administración subcrónica de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> sobre la activación glial, viabilidad y degeneración neuronal.	124
Figura 55. Estructura química de GABA, ácido nílico (nla), ácido 2-metilbutanóico (mba) y ácido tíglico (tga).	132

Índice de tablas

Tabla 1. Fitoquímicos bioactivos en plantas medicinales.	19
Tabla 2. Plantas medicinales con constituyentes activos que ayudan en la neuroprotección.	21
Tabla 3. Blancos farmacológicos de algunos metabolitos secundarios sobre SNC.	22
Tabla 4. Usos tradicionales de algunas plantas del género <i>Ipomoea</i>	26
Tabla 5. Compuestos y actividades biológicas presentes en algunas <i>Ipomoeas</i>	27
Tabla 5. Compuestos y actividades biológicas presentes en algunas <i>Ipomoeas</i> (<i>Continuación</i>).	28
Tabla 6. Estudios previos de compuestos presentes en algunas <i>Ipomoeas</i>	29
Tabla 8. Condiciones control y experimentales para los ensayos <i>in vitro</i> de liberación de GABA. .	63
Tabla 9. Modelos experimentales d epilepsia.	92
Tabla 10. Efecto proconvulsivante de PTZ.	96
Tabla 11. Condiciones experimentales para la evaluación de la actividad anticonvulsiva.	98
Tabla 12. Actividad anticonvulsiva de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> en un modelo murino agudo. .	102
Tabla 13. Actividad anticonvulsiva de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> en un modelo murino subcrónico.	103
Tabla 14. Efecto anticonvulsivo de <i>escamonina 1</i> y <i>tiriantina C</i> en un modelo de “PTZ-crónico”.	105

Abreviaturas

↑	Aumento	#	Número
↓	Disminución	[]	Concentración
<	Menor que	%	Porcentaje
>	Mayor que	\bar{x}	Media
=	Igual	±	Más / Menos
p	Significancia	α	Alfa
β	Beta	γ	Gama
s	Segundo	°C	Grados centígrados
mm	Milímetro	mM	Milimolar
cm	Centímetro	μm	Micrómetro
μg	Microgramo	μm	micrómetro
ml	Mililitro	M	Molar
mg	Miligramo	μM	Micromolar
kg	Kilogramo	μl	Microlitro
%CC	Porcentaje de células conservadas	pmol	Picomola
Rf	Factor de retención	Tab.	Tabla
NA	No aplica	Fig.	Figura
CN	Control negativo	c/u	Cada uno
CP	Control positivo	pH	Potencial de hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal	Ctx	Corteza cerebral
r.p.m.	Revoluciones por minuto	GD	Giro dentado
Hp	Hipocampo	CA	<i>Cornu Ammonis</i>
ED50	Dosis efectiva 50	ANOVA	Análisis de varianza
UV	Ultravioleta	MIC	Concentración mínima inhibitoria
RP	Fase reversa	SEM	Error estándar de la media
NaCl	Cloruro de sodio	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico	H-E	Hematoxilina-eosina
KCl	Cloruro de potasio	DPX	Resina acrílica con base de xileno
CaCl₂	Cloruro de calcio	VPA	Valproato
MgSO₄	Sulfato de magnesio	GAD	Glutamato descarboxilasa
C₄H₁₁NO₃	Tris(hidroximetil)aminometano	cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid	ATP	Adenosín trifosfato
OPA	O-ftaldialdehido	NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
BSA	Albúmina de suero bovino	AAO	Ácido aminoxiacético
CH₂Cl₂	Diclorometano	K⁺	Ión potasio
CH₃OH	Metanol o MeOH	Na⁺	Ión sodio
H₂O	Agua	Cl⁻	Cloruro
CH₃CN	Acetonitrilo	Ca²⁺	Ión calcio
Li⁺	Ión litio	nla	Ácido nílico
tga	Ácido tíglico	mba	Ácido 2-metilbutanóico
PTZ	Pentilentetrazol	GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A	Neu-N	Antígeno nuclear neuronal
GABA	Ácido gama aminobutírico	MAO	Monoamino oxidasa
PAF	Factor activador de plaquetas	COMT	Catecol O-metiltransferasa

5-HT	5-hidroxitriptamina	ACh	Acetilcolina
NBAD	N-b-alanyldopamine	DA	Dopamina
GAA	Ácido α -glucosidasa	GABA-T	GABA transaminasa
Qui	Quinovosa	Glc	Glucosa
Rha	Ramnosa	GAT	Transportador de GABA
GABAA	GABA tipo A	GABAB	GABA tipo B
SNC	Sistema nervioso central	SQC-1	Carcinoma de cérvix
KB	Carcinoma epidermoide oral	OVCAR	Carcinoma de ovario
HCT-15	Carcinoma de colon	Sf9	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
COSY	Espectroscopía de correlación	FAB	Bombardeo de átomos acelerados
TOCSY	Espectroscopia de correlación total	ESI	Ionización por electrospray
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear de Overhauser	HMBC	Correlación heteronuclear cuántica múltiple
ROESY	Espectroscopía rotatoria de efecto nuclear Overhauser	CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple	HPLC o CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
RMN	Resonancia magnética nuclear	CCF	Cromatografía en capa fina
MS	Espectrometría de masas	EM-MALDI-TOF	Espectrometría de masas de ionización láser asistida por matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo

Resumen

México cuenta con una gran variedad de plantas pertenecientes al género *Ipomoea*, de las cuales algunas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos de origen nervioso. *Ipomoea tyrianthina* Lindley (Convolvulaceae) es una hierba ampliamente distribuida en la República Mexicana (León *et al.*, 2008), cuyas resinas glicosídicas aisladas de sus raíces, han demostrado que tienen actividades sobre el SNC. Recientemente, la caracterización de algunos de los metabolitos aislados de estas resinas glicosídicas (León *et al.*, 2008) y algunos estudios han concluido que este tipo de metabolitos tienen diferentes tipos de actividad sobre el SNC (p. ej., sedante, antidepresivo, anticonvulsivo y/o neuroprotector); y que probablemente ésta se deba al efecto que tienen sobre los mecanismos de regulación de la neurotransmisión GABAérgica, evocando la liberación de ácido γ -aminobutírico (GABA) endógeno liberado (Herrera *et al.*, 2007; Mirón *et al.*, 2007; Castro, 2011; León *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2018). Debido a que los compuestos obtenidos a partir de extractos de *Ipomoea tyrianthina* podrían llegar a ser utilizados en el diseño de nuevos fármacos neuroactivo, es necesario conocer más sobre su mecanismo de acción. Por lo que este trabajo planteó realizar la purificación y evaluación farmacológica de *escamonina 1* y *tiriantina C*, lo cual ayudaría a entender el posible mecanismo de acción GABAérgico de sus propiedades neuroprotectoras y anticonvulsivas.

Los glicolípidos se purificaron e identificaron de acuerdo con lo descrito en las publicaciones de Mirón *et al.* (2007) y León *et al.* (2014), a partir de un extracto metanólico de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*. La evaluación farmacológica se llevó a cabo bajo modelos *in vitro* (liberación de neurotransmisores) e *in vivo* (actividad anticonvulsiva), analizando su efecto sobre la corteza cerebral de ratón.

Con respecto a los resultados obtenidos, *tiriantina C* resultó ser un nuevo compuesto reportado para esta planta (León *et al.*, 2014). Ambos compuestos aumentaron la concentración de GABA endógeno en los ensayos *in vitro*, modificando su liberación a través de mecanismos dependientes de la concentración de calcio extracelular y, para el caso de *tiriantina C*, dependiente de la dosis. La administración aguda de *escamonina 1* y *tiriantina C* disminuyó el número de convulsiones e incrementó el tiempo de latencia a la convulsión con respecto a las dosis administradas, mostrando

16.7 %, 66.7 % y 100 % de protección a la convulsión. Las dosis de 80 mg/kg de ambos glicolípidos disminuyeron las alteraciones neuronales (neurodegeneración), activación astrocítica y el edema intersticial generado por la inducción con PTZ en áreas como la corteza e hipocampo (giro dentado y CA3). La dosificación subcrónica de *escamonina 1* y *tiriantina C* aumentó su efecto anticonvulsivo y protector similar con respecto a la dosis aguda de 40 mg/kg.

Todo lo anterior sugiere que la actividad anticonvulsiva y neuroprotectora de *escamonina 1* y *tiriantina C* se da a través de mecanismos GABAérgicos, en donde el aumento en la liberación del GABA endógeno (principalmente por vía-vesicular) contrarresta el efecto excitotóxico generado por la convulsión inducida por PTZ. Además, el efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la reactividad astrocítica y presencia de edema, pudiera sugerir que poseen actividad antiinflamatoria y/o antioxidante.

Abstract

There is great variety of plants from the genus *Ipomoea* and some of them are species that have been used in traditional medicine for the treatment of diseases of nervous origin. *Ipomoea tyrianthina* Lindley (Convolvulaceae) is an herb widely distributed in Mexico (León et al., 2008), whose glycosidic resins isolated from its roots have been shown to have activities on the CNS. Recently, the characterization of some compounds isolated from these glycosidic resins (León et al., 2008) and some studies have concluded that these metabolites have different types of activity on the CNS (eg, sedative, antidepressant, anticonvulsant and / or neuroprotective), probably due to the effect that they have on the mechanisms of regulation of GABAergic neurotransmission, evoking the release of released endogenous γ -aminobutyric acid (GABA) (Herrera et al., 2007; Mirón et al., 2007; Castro, 2011; León et al., 2014; Castro et al., 2018). Since the compounds obtained from extracts of *Ipomoea tyrianthina* could be used in the design of new neuroactive drugs, result necessary to know more about their mechanism of action. So, this work raised the purification and pharmacological evaluation of scammonin 1 and tyrianthin C, which would help to understand the possible mechanism of GABAergic action of its neuroprotective and anticonvulsant properties.

The glycolipids were purified and identified according to that described in the publications of Mirón et al. (2007) and León et al. (2014), from a methanolic extract of the root of *Ipomoea tyrianthina*. The pharmacological evaluation was carried out under *in-vitro* models (neurotransmitter release) and *in-vivo* (anticonvulsive activity), analyzing its effect on the mouse cerebral cortex.

With respect to the obtained results, tyrianthin C turned out to be a new compound reported for this plant (León et al., 2014). Both compounds increased the concentration of endogenous GABA in the *in vitro* tests, modifying their release through mechanisms dependent on extracellular calcium concentration and, for the case of tyrianthin C, dose-dependent. The acute administration of scammonin 1 and tyrianthin C decreased the number of seizures and increased the latency time to convulsion with respect to the doses administered, showing 16.7%, 66.7% and 100% protection against convulsions. The doses of 80 mg / kg of both glycolipids decreased neuronal alterations (neurodegeneration), astrocytic activation and interstitial edema generated by induction with PTZ in

areas such as the cortex and hippocampus (dentate gyrus and CA3). The subchronic dosing of scammonin 1 and tyrianthin C increased its anticonvulsant and protective effect respect to the acute dose of 40 mg / kg.

All the above suggests that the anticonvulsant and neuroprotective activity of scammonin 1 and tyrianthin C occurs through GABAergic mechanisms, where the increase in the release of endogenous GABA (mainly through a vesicular route) counteracts the excitotoxic effect generated in seizure induced by PTZ. In addition, the effect of scammonin 1 and tyrianthin C on astrocytic reactivity and presence of edema, may suggest that they possess anti-inflammatory and / or antioxidant activity.

Capítulo 1 : Generalidades

1.1 Introducción

Existe una amplia gama de productos naturales aislados de plantas (extractos crudos, fracciones activas y compuestos naturales) y que constituyen fuentes potenciales de agentes terapéuticos y/o moléculas modelo para la síntesis de nuevos fármacos (Astudillo *et al.*, 2009); además de proporcionar la materia prima de la industria moderna en la elaboración de agroquímicos, cosméticos, colorantes, saborizantes, plaguicidas y fragancias.

Con el desarrollo científico y tecnológico, se ha logrado aislar una gran variedad de moléculas sintetizadas por las plantas (p. ej., alcaloides, terpenoides, flavonoides, glicolípidos, etc.) y cuyas propiedades (composición química, concentración, localización y actividad biológica) pueden varían considerablemente de una especie a otra, e inclusive en la misma especie.

Estas moléculas son sintetizadas como producto del metabolismo secundario de las plantas, y suelen encontrándose como mezclas complejas de metabolitos, tales como las resinas secretadas por plantas del género *Ipomoea* (Pichardo, 2004).

Estudios realizados con algunos compuestos encontrados en estas resinas, han mostrado tener actividad biológica de tipo farmacológico (p. ej., hipotensora, ionopórica, moduladora), lo cual los relaciona con el uso tradicional de estas plantas en el tratamiento de enfermedades cardiacas, infecciones (p. ej., bacterianas o fúngicas), hipertensión, alteraciones neurológicas (p.ej., esquizofrenia, depresión, epilepsia, ansiedad), cáncer, trastornos digestivos (p. ej., como laxante o purgante, disentería), dolor abdominal, hidrocefalia, meningitis y procesos inflamatorios. Además, también se han utilizado en otras áreas de interés tales como el económico (p. ej., la agricultura y ornamental) o el religioso (Nagano *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2007; Escobedo y Pereda, 2007; Xie *et al.*, 2010; Chérigo y Pereda, 2006; Postema *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 1999).

Una de las especies con la que se ha trabajado recientemente es la *Ipomoea tyrianthina*, que al igual que otras plantas del mismo género, producen resinas que contienen compuestos glicolipídicos y a

los cuales se les han atribuido efectos de tipo neuroactivo. Actualmente ya se han tipificado y purificado algunos compuestos encontrados en ellas, tales como escamonina, ácido tiriantínico, tyrianthina y ácido jalapilónico (Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009).

Para el caso de los ácidos tiriantínicos (I y II) y las tiriantinas (I y II), estudios farmacológicos han demostrado que poseen diferentes actividades biológicas (León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009), de entre las cuales se destaca su efecto sobre la liberación de GABA, sugiriendo una posible relación de estos metabolitos con los efectos sedante, anticonvulsivo y neuroprotector que se le atribuyen al uso de los extractos de la raíz de esta planta.

Debido a que el conocimiento de este tipo de compuestos se limita a los estudios referentes con las interacciones estructura-función y la fitoquímica de estas resinas, el presente proyecto busca establecer el mecanismo por el cual la *escamonina I* y *tiriantina C* incrementa la concentración de GABA en ensayos *in vitro* con rebanadas de corteza cerebral de ratón y sugerir su posible mecanismo de acción en relación que tienen con el efecto neuroprotector que se le atribuye a *Ipomoea tyrianthina*.

1.1.1 Plantas medicinales: fitoquímica y actividad biológica

En México se conoce una gran variedad de especies vegetales que poseen propiedades terapéuticas (Tripathi y Tripathi, 2003; Villa *et al.*, 2011; Pereda y Bah, 2003). Los productos medicinales a base de extractos vegetales son mezclas complejas de compuestos químicos que han sido utilizados tradicionalmente para el tratamiento de diversas enfermedades.

Las sustancias activas o fitoquímicos responsables de dichas propiedades son compuestos biológicamente activos de origen natural que se encuentran en las plantas, y que proporcionan beneficios para la salud de los seres humanos más allá de las atribuidas a los macronutrientes y micronutrientes (Saxena *et al.*, 2013).

Los fitoquímicos han sido clasificados como metabolitos primarios o secundarios, según su función en el metabolismo de la planta, sus características físicas y químicas. Los metabolitos primarios incluyen a los azúcares comunes, aminoácidos, proteínas, purinas y pirimidinas de ácidos nucleicos,

etc.; y los secundarios son los metabolitos restantes de las plantas, tales como alcaloides, terpenos, flavonoides, lignanos, esteroides vegetales, curcuminas, taninos, saponinas, compuestos fenólicos y glucósidos (Saxena *et al.* 2013).

Tabla 1. Fitoquímicos bioactivos en plantas medicinales.

Clasificación	Compuestos principales	Función biológica
Polisacáridos no almidón	Celulosa, hemicelulosa, gomas, mucilagos, pectinas, ligninas.	Capacidad de retención de agua, retarda la absorción de nutrientes, una toxina y ácidos biliares.
Antibacterial y antifúngica	Terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos.	Inhibidor de microorganismos, reduce el riesgo de infección fúngica.
Antioxidantes	Compuestos polifenólicos, flavonoides, carotenoides, tocoferoles, ácido ascorbico.	Inactivación de radicales libres del oxígeno, inhibición de la peroxidación lipídica.
Anticancer	Carotenoides, polifenoles, curcumina, flavonoides.	Inhibidores tumorales, inhibe el desarrollo del cancer de pulmón, actividad antimetastásico.
Agentes detoxificantes	Ácidos reductores, tocoferoles, fenoles, indoles, isotiocianatos aromáticos, cumarinas, flavonoides, carotenoides, retinodes, cianatos, fitosteroles.	Inhibidor de la activación de procarcinogenes, inductor de drogas de unión a carcinogenes, inhibidores de carcinogénesis.
Otros	Alcaloides, terpenoides, compuestos volátiles con aroma, aminas biogénicas.	Agentes neurofarmacológicos, antioxidantes, quimiopreención de cáncer.

Se muestran algunas actividades biológicas, funciones y compuestos presentes en las plantas medicinales (Saxena *et al.*, 2013).

Actualmente se conocen más de 4000 fitoquímicos, de los cuales cerca de mil son medicinales y solo alrededor de 150 han sido estudiados en detalle (Saxena *et al.*, 2013). A estos últimos se les atribuyen propiedades biológicas tales como la actividad antioxidante, efecto antimicrobiano, la modulación de las enzimas de desintoxicación, la estimulación del sistema inmunológico, disminución de la agregación plaquetaria, la modulación del metabolismo de las hormonas y la propiedad contra el cáncer. En la tabla 1 se muestran algunos fitoquímicos bioactivos encontrados en plantas medicinales, su clasificación y función biológica (Saxena *et al.*, 2013).

1.1.2 Plantas con actividad neuroprotectora

Numerosos extractos vegetales han sido usados tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC), especialmente para condiciones crónicas tales como la ansiedad, depresión, insomnio, cefaleas y epilepsia (Wu *et al.*, 2011), aunque los mecanismos precisos de acción de los medicamentos a base de plantas aún no se han determinado (Kumar y Khanum, 2012). Un ejemplo de este tipo de extractos y compuestos son los obtenidos de plantas pertenecientes al género *Ipomoea*, a los cuales se les han atribuido actividades bactericidas, ionopóricas, citotóxicas, sedantes, neuroprotectoras, anticonvulsivas, antidepresivas y ansiolíticas, entre otras (Herrera *et al.*, 2007; Pereda *et al.*, 2009).

Una de las especies con la cual se ha estado trabajando recientemente es *Ipomoea tyrianthina*, que al igual que otras plantas del mismo género, produce resina que contienen glicolípidos, a los cuales se les ha relacionado con sus efectos medicinales, principalmente sobre SNC. Muchas de las drogas sintéticas más usadas deben su origen a la medicina complementaria a base de plantas medicinales (Quintans *et al.*, 2008), destacando aquellas con actividad anticonvulsiva y/o neuroprotectora. Por lo que se ha generado mayor interés científico por la identificación y caracterización de nuevas plantas medicinales que sea de utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y lesiones cerebrales.

Actualmente, varias publicaciones reportan las propiedades neuroprotectoras de compuestos naturales, incluyendo α -tocoferol, licopeno, resveratrol, ginkgo biloba y ginsenósidos, centrándose en el hecho de que muchos de ellos poseen actividad antioxidante (Tab. 2).

De acuerdo con la revisión publicada por Quintans *et al.* (2008), algunos estudios han mostrado que algunas cumarinas y triterpenoides naturales provenientes de plantas exhiben propiedades anticonvulsivantes y posiblemente neuroprotectoras. Sin embargo, este grupo de compuestos no son los únicos con este tipo de actividades (Quintans *et al.*, 2008), y han demostrado ejercer acciones neuroprotectoras en modelos de cultivo de células animales y de los trastornos neurológicos.

Tabla 2. Plantas medicinales con constituyentes activos que ayudan en la neuroprotección.

Planta	Componente activo	Grupo fitoquímico	Actividad
<i>Acorus calamus</i>	Asarona	Monoterpeno	Sedante, mejora la memoria y el intelecto
<i>Cruciferous</i>	Sulforafano	Isothiocyanate	Disminuye el edema cerebral
<i>Centella asiática</i>	Asiaticosido, cemtellosido, madecassosido, ácido asiático	Saponinas triterpenoides	Estimula la actividad cerebral, cognición y tiene efecto anti-ansiedad
<i>Corydalis ternata</i>	Protropina	Alcaloide	Anti-colesterasa y anti-amnésico
<i>Cúrcuma longa</i>	Curcumina	Fenoles	Protege contra disfunción sináptica
<i>Emblica officinalis</i>	Vitamina C, filembin	Vitamina, polifenol	Anti-colinesterasa
<i>Evolvulus alsinoides</i>	Betaina, sankapushpina y evolvina	Alcaloides	Mejora la memoria y se usa en el tratamiento de demencia
<i>Ginkgo biloba</i>	Bilobolido, ginkgolidos, kaemferal, quercetina, isorhamnetina sitosterol y estigmasterol	Terpenoides, flavonoides, esteróides	Acción corticosterona que produce atrofia neuronal y muerte celular en hipocampo
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glicirrhizina	Saponinas triterpenoides	Involucradas en el aprendizaje y memoria en desórdenes neurológicos causados por escopolamina
<i>Huperzia serrata</i>	Huperzina A y B	Alcaloides	Acción sobre sistema neuromuscular relacionado con la actividad colinesterasa
<i>Ilex paraguariensis</i>	Ácido cafeinclorogenico, teofilina, quercetinteobromina, kaemferol	Polifenoles, xantanos, flavonoides	Mejora la memoria en la demencia
<i>Magnolia officinalis</i>	4-o-metil honokiol, honokiol, magnolol	Fenoles	Tratamiento de neurosis, ansiedad, demencia, y accidente cerebrovascular
<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Rincofilina, corinoxeina, isorincofilina, isocorinoxeina	Alcaloides	Efecto neuroprotector contra la pérdida neuronal causada por isquemia
<i>Zingiber officinale</i>	Gingerol, shogaol, zingerona	Fenoles	Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa cerebral
<i>Ziziphus spinosa</i>	Jujubosido A y B	saponinas	Acción anti-calmodulina

Tabla modificada de Kumar y Khanum (2012).

Por otro lado, el efecto neuroprotector de algunos fitoquímicos se encuentra también relacionado con su capacidad de modificar la excitabilidad neuronal mediante la activación o inhibición de receptores o canales iónicos específicos (Tab. 3).

Tabla 3. Blancos farmacológicos de algunos metabolitos secundarios sobre SNC.

Planta	Grupo fitoquímico	Acción sobre neurotransmisor/receptor
<i>Allium sativum</i>	Compuestos organosulfurados	Inhibición de HMG-CoA
<i>Ginkgo biloba</i>	Terpenolactonas	Agonista antioxidante de GABA, inhibición de PAF
<i>Hypericum perforatum</i>	Naftodiantrona	Inhibición de la recaptura de 5-HT, MAO, inhibición de COMT
<i>Panax ginseng</i>	Saponina triterpenoide, glicósidos	Agonista de ACh, actividad DA
<i>Piper methysticum</i>	Metistacina y dihidrometistacina	Unión a receptor GABA _A , inhibición del canal de sodio
<i>Terminalia chebula</i>	Ácidos fenólicos y orgánicos	Ligado a la actividad de los receptores NBAD y GAA
<i>Valeriana officinalis</i>	Sesquiterpenos	Unión a los receptores GABA _A /GABA _B
<i>Withania somnifera</i>	Witanolidos, witanoles	Mejora la actividad del receptor muscarínico M1 y aumenta los sitios de unión al receptor muscarínico M2

Tabla modificada de Kumar y Khanum (2012).

Recientemente, se han estudiado compuestos de tipo glicosídico, que han mostrado tener una gran gama de actividades biológicas, entre las que destacan aquellas relacionadas con sistema nervioso central y, por lo tanto, con la actividad anticonvulsiva y/o neuroprotectora. El efecto que tienen este tipo de compuestos sobre el sistema nervioso central, modificando el proceso de neurotransmisión en la corteza cerebral, ha sido asociado con el funcionamiento de los sistemas de inhibición de la neurotransmisión, específicamente del ácido gamma aminobutírico (GABA) o bien sobre la función de los sistemas excitatorios (glutamato y aspartato), ambos relacionados con la generación de convulsiones y/o daño neuronal (López, 2005).

Algunos de los primeros fármacos utilizados para estudiar los receptores ionotrópicos de GABA son de origen vegetal, incluyendo a los antagonistas como la bicuculina (de *Dicentra cucullaria*) y picrotoxina (de *Anamirta cocculus*), y agonistas como el muscimol (*Amanita muscaria*); las cuales son conocidas por poder cruzar la barrera hematoencefálica y ser capaces de influir en la función cerebral. Otros mantienen niveles bajos de activación de los receptores de glutamato para mejorar la plasticidad sináptica y proteger a las neuronas contra la disfunción y la degeneración, en parte mediante la inducción de la expresión del factor neurotrófico.

Actualmente hay una gran variedad de productos naturales (p. ej., flavonoides y terpenos) pueden modular la función de los receptores ionotrópicos de GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso. Estos compuestos se han encontrado en la fruta (p. ej., pomelo), verduras (p. ej., cebolla), diversas bebidas (incluyendo el té, el vino tinto y el whisky), y en preparados a base de plantas (como el *Ginkgo biloba* y *ginseng*).

Algunos estudios *in vitro* reportan que extractos y metabolitos puros obtenidos de la raíz de plantas del género *Ipomoea* (familia Convolvulaceae) evocan un incremento en la liberación de GABA y ácido glutámico en la corteza cerebral. De esta manera, se han relacionado las propiedades medicinales de plantas como *Ipomoea stans* (Herrera *et al.*, 2007) e *Ipomoea tyrianthina* con la posible alteración de los mecanismos de liberación de dichos neurotransmisores (Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009; Castro, 2011; León *et al.*, 2014).

1.1.3 Neuroprotección y neurodegeneración

La neuroprotección se refiere a cualquier sustancia o molécula, sintética o biológica con efectos protectores en el sistema nervioso, que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de algunas enfermedades neurodegenerativas crónicas o de lesiones cerebrales agudas. Los compuestos neuroprotectores evitan la degeneración y muerte de las neuronas.

Con respecto a los eventos que generan el daño neurológico a nivel celular (neurodegeneración), se observa inicialmente una falla energética (daño mitocondrial) generada por la interrupción del aporte de oxígeno y glucosa a la célula. Posteriormente, se da la excitotoxicidad por el incremento de

neurotransmisores excitatorios como el glutamato en el espacio extracelular, el incremento de la concentración de calcio intracelular, se produce daño oxidativo por la excesiva cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno presentes en el tejido nervioso, el aumento de la respuesta inflamatoria (como consecuencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica) y, finalmente, la activación de las señales de muerte celular programada (apoptosis).

Para revertir o retrasar el proceso de neurodegeneración, se han desarrollado estrategias neuroprotectoras que intentan regular o detener los principales mecanismos de daño celular; sin embargo, aún existe la necesidad de encontrar nuevas moléculas neuroprotectoras de efectividad integral.

1.2 Antecedentes

1.2.1 La familia Convolvulaceae: género *Ipomoea*

La familia Convolvulaceae incluye aproximadamente 40 géneros, dentro de los cuales se enlistan más de 1500 especies. Tiene una distribución casi cosmopolita, aunque alcanza su mayor diversificación en latitudes intertropicales, particularmente en regiones que presentan temporadas secas.

Aunque las Convolvulaceae son mejor conocidas por su hábito trepador, varias especies son arbóreas, otras son arbustivas y no pocas se encuentran como plantas herbáceas erectas o postradas que suelen tener las hojas en forma de corazón. Las flores comúnmente destacan por su aspecto infundibuliforme y sus colores brillantes, pero en una muy alta proporción son efímeras, limitándose la antesis a las horas matinales (Carranza, 2001; Meira *et al.*, 2012). La mayoría de las convolvuláceas se encuentran en hábitats soleados y abiertos, mientras muy pocas sobreviven en bosques umbrófilos.

La importancia económica de las convolvuláceas es considerable. La especie más relevante es *Ipomoea batatas* (L.) Lam., el camote, una planta cultivada a escala mundial, originaria del Nuevo Mundo, quizá de procedencia mexicana, aunque algunos autores se inclinan en asignarle origen sudamericano.

Varias proveen una fuente de medicamentos purgantes, tal como la “purga de Xalapa”, *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne, la cual tiene una larga historia comercial y se usa desde los tiempos precolombinos. Otras especies de México producen semillas que al ingerirse son alucinógenas (por ejemplo, *Turbina corymbosa* L. Raf. e *Ipomoea tricolor* Cav.), y aun algunas se usan como un medio adivinatorio en las tradiciones indígenas. Probablemente más de la mitad de las especies de Convolvulaceae tienen potencial hortícola ornamental y muchas de ellas se encuentran en jardines y huertos familiares en gran parte de México (Carranza, 2001; Meira *et al.*, 2012).

Una de las características anatómicas más notables de las Convolvulaceae es la existencia de células especializadas en secretar resina glucosídica en los tejidos foliares y en las raíces de las plantas (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Estas glicoresinas constituyen un importante marcador taxonómico de esta familia (Wagner, 1973) y son responsables de las propiedades purgantes de algunas especies del Convolvulaceae (Pereda y Bah, 2003; Meira *et al.*, 2012).

1.2.1.1 Género *Ipomoea*

El género *Ipomoea*, con aproximadamente 600 a 700 especies, comprende el mayor número de especies en la familia Convolvulaceae (Austin y Huáman, 1996). Tiene distribución en zonas tropicales, aunque algunas especies llegan también a las zonas templadas (Cao *et al.*, 2005). Las especies de este género se encuentran principalmente a través de los países de América del Sur y Centroamérica, y los territorios de África Tropical (Meira *et al.*, 2012).

Las plantas del género *Ipomoea* han tenido un papel importante en algunas culturas. Esto se debe a su uso con fines económicos, impactando desde el punto de vista alimenticio, farmacéutico, generando moléculas con principios activos usados en medicina, rituales, agronomía, como plantas ornamentales, herbicidas, protegiendo infraestructura carretera, portuaria o agrícola (Díaz, 2009; Meira *et al.*, 2012). La gran diversidad de metabolitos secundarios que producen estas plantas puede conferirle propiedades selectivas a nivel biológico, por lo que son ampliamente usadas en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo para el tratamiento de diversos padecimientos (Escobedo y Pereda, 2007; Hernández *et al.*, 1999; Pereda y Bah, 2003; Meira *et al.*, 2012), tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Usos tradicionales de algunas plantas del género *Ipomoea*.

Especies	Usos tradicionales
<i>I. aquatica</i>	Tratamiento de diabetes y debilidad, antídoto contra el veneno de alacrán, emético, diurético, purgante, enfermedades del hígado, tiña, leucoderma, lepra, fiebre, hipertensión arterial, hemorragia nasal.
<i>I. asarifolia</i>	Contra la comezón.
<i>I. batata</i>	Tratamiento de tumores de boca y garganta. Las decocciones de hojas son usadas como afrodisiaco, astringente, bactericida, fungicida, laxante, tónico y emoliente. El camote es usado en el tratamiento del asma, quemaduras, catarro, ciguatera (intoxicación), diarrea, fiebre, náusea, renois, esplenosis, distensión estomacal, tumores. En Japón, una variedad de camote blanco ha sido comida para el tratamiento de anemia, hipertensión y diabetes.
<i>I. cairica</i>	Tratamiento de reumatismo y de inflamaciones.
<i>I. campanulata</i>	Antídoto contra el veneno de serpiente.
<i>I. carnea</i>	Contra el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y tratar la hipertensión.
<i>I. digitata</i>	La raíz pulverizada es usada en desnutrición infantil. Como tónico, afrodisiaco, emoliente, estimula la producción de leche y la expulsión de bilis. Las decocciones de raíz para el tratamiento del estreñimiento.
<i>I. indica</i>	Como purgante y para curar huesos rotos.
<i>I. leptophylla</i>	El humo de la raíz quemada se usa en el tratamiento de enfermedades nerviosas. La raíz usada para la distensión estomacal y como tónico.
<i>I. muricata</i>	Tratamiento de enfermedades de la piel y heridas gangrenosas, cortadas y ampollas por quemaduras. Preparaciones de esta planta en glicerol son usadas para el tratamiento de faringitis y otitis externa.
<i>I. murucoides</i>	El humo del árbol quemado es usado contra mosquitos. Infusiones de las hojas, corteza y flores para el tratamiento de inflamación y de picaduras de alacrán.
<i>I. nil</i>	Tratamiento contra el cáncer.
<i>I. orizabensis</i>	Como purgante, antihelmíntico y tratar fiebre abdominal, disentería, epilepsia, hidrocefalia, meningitis y tumores.
<i>I. pes-caprae</i>	Tratamiento de procesos inflamatorios y algésicos. Las hojas calientes se usan para tratar heridas, infecciones de la piel, dolor por inflamación y contra la picadura de peces venenosos, manta raya e insectos. Las infusiones son recomendadas para el tratamiento de hipertensión y enfermedades del hígado. Decocciones para el tratamiento de desórdenes digestivos, cólico, dolor interno y externo, disentería, inflamación, fatiga, tensión, artritis y reumatismo. Las raíces son usadas en desórdenes diuréticos y estreñimiento.
<i>I. purga</i>	Como purgante.
<i>I. purpurea</i>	Las infusiones son usadas como diurético, para detener hemorragias, como purgante y tratar la sífilis.
<i>I. stans</i>	Las infusiones de las raíces han sido usadas en el tratamiento de convulsiones epilépticas, nefritis, enfermedades oftálmicas, parálisis, antiespasmódico y agente sedante.
<i>I. stolonifera</i>	Como diurético y tratar el dolor después del parto, problemas estomacales, inflamación, forunculosis, heridas e hinchazón.

(Pereda *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009; Mirón *et al.*, 2007; Postema *et al.*, 2009; Escobedo y Pereda, 2007; Chérigo y Pereda, 2006; Castañeda y Pereda, 2011; Meira *et al.*, 2012).

El conocimiento etnomédico sobre las *Ipomoeas*, impulsó el interés científico de estudiar la fitoquímica de este género de forma intensiva desde 1950.

Debido a las diversas propiedades medicinales de las resinas producidas por las *Ipomoeas*, se ha sugerido que estas plantas constituyen una fuente rica de metabolitos secundarios a evaluar por estudios químicos y farmacológicos (Pereda y Bah, 2003; Meira *et al.*, 2012). Dentro de los metabolitos aislados de sus resinas, encontramos compuestos tales como alcaloides de ergolina, alcaloides de indolizidina, alcaloides de nortropano, compuestos fenólicos, cumarinas, norisoprenoides, diterpenos, isocumarinas, bencenoides, flavonoides, antocianósidos, lignanos, triterpenos y glicolípidos; y que podrían ser responsables de las actividades biológicas antes mencionadas (Yu *et al.*, 2011).

Recientemente, se han destacado los estudios realizados sobre los glicolípidos, que se han visto representados principalmente por glicósidos tetrasacáridos y pentasacáridos, de los cuales varios de ellos tienen actividades biológicas específicas con potencial aplicación en el área médica (Yu *et al.*, 2011). La tabla 5 muestra a algunas de las especies de *Ipomoea* que han sido estudiadas por mostrar actividad antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, espasmogénica, antinociceptiva, hipotensora y anticancerígena (Meira *et al.*, 2012).

Tabla 5. Compuestos y actividades biológicas presentes en algunas *Ipomoeas*.

Planta	Compuesto	Actividad	Referencia
<i>I. tricolor</i>	Tricolorinas	Fitotóxica, Citotóxica, Antimicrobiana, Altera la permeabilidad de membrana.	Pereda <i>et al.</i> , 2009; Meira <i>et al.</i> , 2012.
<i>I. stans</i>	Extracto de acetato de etilo	Anticonvulsivo, Neuroprotector, Ansiolítico, Depresora, ↑ [GABA] y [glutamato] en SNC.	Herrera <i>et al.</i> , 2007; León <i>et al.</i> , 2008; Meira <i>et al.</i> , 2012.
	Extracto acuoso	Vasorelajante, Antiespasmódico, Antioxidante.	
	Extracto de metanol	Anticonvulsivo.	
	Stansinas	Citotóxica.	
<i>I. leptophylla</i>		Antimicrobiana.	León <i>et al.</i> , 2008.

Tabla 5. Compuestos y actividades biológicas presentes en algunas *Ipomoeas* (Continuación).

Planta	Compuesto	Actividad	Referencia
<i>I. purga</i>	Purginosidos y Purgina	Antiinflamatoria, Antibacteriana.	Castañeda y Pereda, 2011.
<i>I. sp</i>	Ipomoeasinas	Citotóxica, Antimicobacteriana, Antifúngica, Fitotóxica.	Nagano <i>et al.</i> , 2009; Postema <i>et al.</i> , 2009.
<i>I. aquamosa</i>	Ipomoeasinas	Citotóxica, Antimicobacteriana, Antifúngica, Fitotóxica.	Meira <i>et al.</i> , 2012.
<i>I. murucoides</i>	Murucinas	Citotóxica	Cherigo y Pereda, 2006; Meira <i>et al.</i> , 2012.
<i>I. pes-caprae</i>	Pescaprosidos y pescapreinas	Citotóxica	Meira <i>et al.</i> , 2012.
<i>I. batatas</i>	Simoninas	Fitotóxica	Meira <i>et al.</i> , 2012.
<i>I. tyrianthina</i> (sin. <i>I. orizabensis</i>)	Extracto de diclorometano	Antidepresivo, relajante, neuroprotector.	Hernández <i>et al.</i> , 1999; Mirón <i>et al.</i> , 2007; León <i>et al.</i> , 2008; León <i>et al.</i> , 2009; Meira <i>et al.</i> , 2012.
	Extracto de metanol	Vasorelajante, Antimicobacteriano, ↑ [GABA] y [glutamato] en SNC.	
	Escamoninas	Neuroprotector, Antiespasmódico, Citotóxico, Antibacteriano.	
	Orizabinas	Laxante, Citotóxico.	
	Triantinas	Antidepresivo, Neuroprotector, Citotóxico, Hipnótico, Anticonvulsivo, Relajante, Antiespasmódico, Antimicrobiano, ↑ [GABA] y [glutamato] en SNC.	
	Ácidos tiriantínicos	Neuroprotector, Citotóxico, Hipnótico, Anticonvulsivo, Antimicobacteriano, ↑ [GABA] y [glutamato] en SNC.	

Sin embargo, a pesar de haber una gran cantidad de trabajos de investigación sobre algunas plantas del género *Ipomoea* (Meira *et al.*, 2012), la mayoría se enfocan principalmente a la purificación, determinación de la actividad biológica, elucidación estructural, e incluso la síntesis química de los metabolitos que producen (Tab. 6).

Tabla 6. Estudios previos de compuestos presentes en algunas *Ipomoeas*.

Autor	Trabajo
Hernández <i>et al.</i> (1999)	Caracterizaron 6 glicolípidos aislados de la raíz de <i>I. orizabensis</i> , incluyendo a la escamonina I y II y cuatro nuevos tetrasacáridos del ácido jalapínico (orizabinas V-VIII). Estos 6 compuestos presentaron actividad citotóxica hacia carcinoma nasofaríngeo.
Adams <i>et al.</i> (2003)	Análisis fitoquímicos sobre las glicoresinas presentes en medicamentos naturistas, determinando los compuestos activos y sus estructuras. Los compuestos aislados presentaron actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> y <i>M. tuberculosis</i> , citotoxicidad a líneas de carcinoma de mama, colon, cérvix, ovario y nasofaríngeo. Se sugiere que el efecto de los compuestos aislados se debe a la actividad que muestran sobre la membrana celular por la formación de poros no selectivos, ligada a la estructura macrocíclica de los compuestos.
Rencurosi <i>et al.</i> (2004)	Elucidaron la estructura cristalina de la tricolorina A, mediante RMN, y su relación con su uso en remedios tradicionales en México.
Pereda <i>et al.</i> (2006)	Evaluaron 22 oligosacáridos pertenecientes a convolvuláceas: tricolorinas (1-7), escamoninas (8, 9) y orizabinas (10-22); cuyo efecto permitirá el desarrollo de potentes inhibidores de las bombas de expulsión de antibióticos sobre cepas multirresistentes de <i>Staphylococcus aureus</i> .
Escobedo y Pereda (2007)	Aislaron y caracterizaron 6 nuevos compuestos oligosacáridos de la resina de <i>I. pes-caprae</i> solubles en hexano: pescaprosido B (1) y pescapresina V-IX (2-6) (7). Dichos compuestos se caracterizaron por poseer unidades monosacáridas de D-fucosa y L-ramnosa.
Herrera <i>et al.</i> (2007)	Determinaron la actividad depresora de un extracto-acetato de etilo de raíces de <i>I. stans</i> sobre la fisiología del SNC. Incrementando el efecto hipnótico del pentobarbital asociado a un proceso depresivo, a dosis bajas del extracto hay actividad neuroprotectora y a dosis altas disminuye la actividad motora, efecto ansiolítico y/o tóxica. Sugieren que posiblemente los compuestos presentes en este extracto actúan sobre los mecanismos de modulación de tipo GABAérgico.
Nagano <i>et al.</i> (2009)	Realizaron la síntesis total de las ipomoeasinas A – F y de análogos, evaluando la relación estructura-actividad de cada una.
Pereda <i>et al.</i> (2009)	Establecieron el posible mecanismo de acción de los glucósidos, evaluando las interacciones de los componentes mayoritarios de las resinas de <i>Ipomoea tricolor</i> , sobre la membrana celular de la línea Sf9 del insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> . Encontraron que la tricolorina A genera un incremento en la permeabilidad de la membrana celular, tanto para cationes (K ⁺ y Na ⁺) como para aniones (Cl ⁻) en una forma dependiente de la dosis y de respuesta inmediata, sugiriendo que estas moléculas originan la formación de poros.
Postema <i>et al.</i> (2009)	Realizaron la síntesis total de la ipomoeasina F y evaluaron su actividad citotóxica sobre la línea celular A 2780 de cáncer de ovario.
Xie <i>et al.</i> (2010)	Realizaron la síntesis total y evaluación de la actividad biológica del batatosido-L; el cuál presentó actividad citotóxica frente a células de carcinoma de laringe (Hep-2). Sugieren que la estructura macrocíclica de glucósido está relacionada con su actividad.
Castañeda <i>et al.</i> (2011)	Realizaron el primer reporte sobre el aislamiento, purificación y elucidación de la estructura de los componentes individuales de la glucoresina contenida en preparaciones con raíz de Jalapa. Los purginosidos I y II y la purgina I mostraron actividad antiinflamatoria y antibacteriana (contra <i>S. aureus</i>).

De lo anterior, es importante destacar que la actividad farmacológica de las *Ipomoeas* sobre el del SNC se ha relacionado con el funcionamiento de la neurotransmisión GABAérgica; tal como se demostró en ensayos con extractos de *I. stans* e *I. tyrianthina*, donde estos generaron un incremento de la concentración de GABA y se asoció a su efecto relajante, neuroprotector (anticonvulsivo), antidepresivo, ansiolítico, y potenciador hipnótico del pentobarbital (Herrera *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; y León *et al.*, 2009).

1.2.2 Las resinas glicosídicas

Con respecto a los usos tradicionales y trabajos de investigación relacionados con las *Ipomoeas* y sus resinas, se han reportado que estas plantas son empleadas en el tratamiento de procesos inflamatorios y dolor, enfermedades renales, estreñimiento, cólico y trastornos digestivos (Meira *et al.*, 2012); relacionadas con actividades tales como antimicrobiana, purgante, analgésica, espasmolítica, espasmogénicas, hipotensora, psicomimética y anticancerígena (Meira *et al.*, 2012; Pereda *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2007; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Arnason *et al.*, 1995). Se ha reportado que aproximadamente las resinas representan entre el 10 – 18 % de los extractos realizados a partir de las raíces de especies de *Ipomoea* (65% jalapina y 30% convolvulina) y que el lugar de crecimiento de las plantas o la época de colecta afectan la composición química de las glicoresinas (Noda *et al.*, 1990; Mirón, 2007; Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 1999).

En evaluaciones farmacológicas, se les han atribuido estos efectos a moléculas que resultan ser los componentes biológicamente activos más comunes en estas plantas: tipo fenol, alcaloides y glicolípidos (Meira *et al.*, 2012). Dos de estos compuestos, los alcaloides del ergot y los glicolípidos, constituyen la característica quimiotaxonómica principal de las especies del género *Ipomoea* (Pereda y Bah, 2003; Meira *et al.*, 2012).

1.2.2.1 Glicolípidos del género *Ipomoea*

Los glicolípidos son compuestos característicos encontrados en las resinas secretadas en los tejidos foliares y radiculares de plantas pertenecientes al género *Ipomoea*. Se sabe que son responsables de la acción purgante de las especies de convolvuláceas importantes que se utilizan en la medicina

tradicional en todo el mundo desde la antigüedad (Hernández *et al.*, 1999; Pereda *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

La presencia de estos compuestos en las resinas producidas por convolvuláceas se dedujo a través de dos enfoques. El primero fue por medio de una lógica etnomédica, asociada a las propiedades laxantes de los medicamentos a base de hierbas. El segundo está relacionado con su aislamiento de los extractos herbales y la identificación de sus productos de hidrólisis, principalmente a través del aislamiento del ácido glicosídico producido bajo saponificación. Actualmente, se han reportado poco más de 239 productos de hidrólisis de estos compuestos (Pereda *et al.*, 2010).

Los glicolípidos han sido clasificados en dos grupos en base a su solubilidad: 1) jalapina (soluble en éter y cloroformo) y convolvulina (insoluble en éter y soluble en metanol). El grupo jalapina comparte la estructura común de un anillo de macrolactona compuesto por un ácido glicosídico acilado. Los miembros del grupo convolvulina poseen pesos moleculares más grandes, lo que podría ser un resultado de ser oligómeros de ácidos glicosídicos (Pereda *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2006).

Debido a la diversidad química de los glicolípidos, estos han sido divididos en grupos basados en el tamaño de su núcleo oligosacárido. Hasta la fecha, han sido identificados 53 ácidos glicosídicos diferentes, de los cuales un gran número se les han dado nombres triviales en función de la planta de la que fueron aislados (Pereda *et al.*, 2010).

1.2.2.2 Química de los glicolípidos

Los glicolípidos encontrados en las resinas de convolvuláceas son un grupo de moléculas de difícil separación y purificación. Esto debido a las dificultades causadas por la presencia de estructuras isoméricas con diferentes ésteres, la determinación de los sitios y extensión de la esterificación, así como las variaciones en la secuencia de glicosilación del núcleo hidrófobo de la molécula (Pereda *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2006).

En los últimos años, la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ha conducido al aislamiento de los componentes puros encontrados en las resinas glicosídicas. Además, el uso de

técnicas contemporáneas tales como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la de espectrometría de masas de alta resolución (MS) permitió la caracterización de su estructura (Mirón, 2007; Pereda *et al.*, 2010).

Estos avances demostraron que las resinas glicosídicas son una mezcla compleja de moléculas anfipáticas que generalmente son de alto peso molecular (Fig. 1) en relación con otras moléculas biológicamente activas, lo que significa que su estructura contiene una parte hidrófoba (agliconas de ácidos grasos) y una hidrófila (azúcar o glicona). Estas características han impedido el aislamiento por CLAR de muestras puras necesarias como estándares cromatográficos para evaluar la calidad de algunos productos (Pereda *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2006; Mirón, 2007; Hernández *et al.*, 1999).

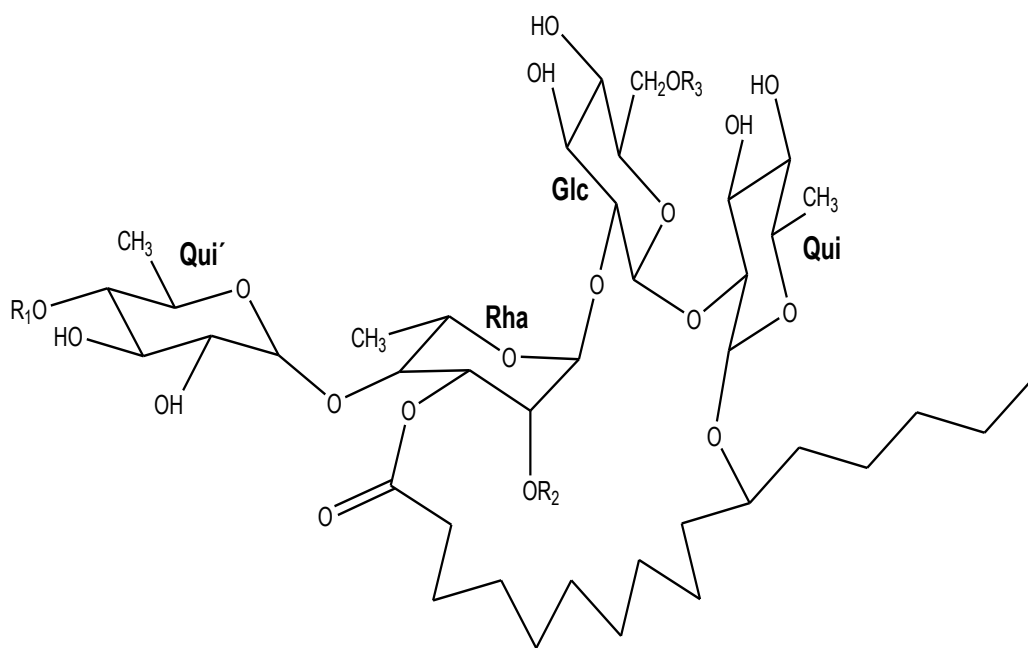


Figura 1. Estructura general de los glicolípidos aislados de las Convolvulaceas. Mostrando el ácido graso de 16 átomos de C, los 4 monosacáridos y las posiciones (R1, R2 y R3) donde se encuentran esterificando los ácidos de cadena corta (tomada de Mirón, 2007).

El núcleo hidrófilo está compuesto por un oligosacárido que va desde uno hasta diez unidades de sacáridos (D-glucosa, manosa, galactosa, L-ramnosa, D-quinovosa, D-xilosa y D-fucosa). La parte hidrófoba o aglicona está formada por un ácido graso monohidroxilado o dihidroxilado (11-hidroxihexadecanoico o jalapínico, y 11-hidroxitetradecanoico o convolvulínico), y ácidos alifáticos de cadena corta y larga esterificando a los sacáridos (acético, propiónico, n-butírico,

isobutírico, tíglico, 2-metilbutanoico, nílico, 2-metilpropanoico, 3-metilbutanoico, octanoico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico y hexadecanoico). Los glicolípidos generalmente poseen un anillo de macrolactona que abarca dos o más unidades de la cadena principal de oligosacárido. (Pereda *et al.*, 2009; Nagano *et al.*, 2009; Escobedo y Pereda, 2007; Xie *et al.*, 2010; Postema *et al.*, 2009; Pereda y Bah, 2003; Tello, 2005; Mirón, 2007; Pereda *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 1999; Noda *et al.*, 1990).

1.2.2.3 Relación estructura-función en las moléculas de glicolípidos con actividad biológica.

Se conocen a numerosos compuestos glicolípidos biológicamente activos de los cuales se ha encontrado que en algunos casos la presencia del residuo glicosídico es crucial para su actividad o que mejora sus parámetros farmacocinéticos.

Recientemente, con el desarrollo de la glicobiología molecular se tuvo una mejor comprensión de la relación que tiene la aglicona con respecto a la actividad biológica del glicolípido, haciendo posible el desarrollo de nuevas “glicodrogas” más activas o eficaces (Kren y Martínková, 2001).

Actualmente se conocen más de 4000 fitoquímicos, de los cuales cerca de mil son medicinales y solo alrededor de 150 han sido estudiados en detalle (Saxena *et al.*, 2013). A estos últimos se les atribuyen propiedades biológicas tales como la actividad antioxidante, efecto antimicrobiano, la modulación de las enzimas de desintoxicación, la estimulación del sistema inmunológico, disminución de la agregación plaquetaria, la modulación del metabolismo de las hormonas y la propiedad contra el cáncer. En la tabla 1 se muestran algunos fitoquímicos bioactivos encontrados en plantas medicinales, su clasificación y función biológica (Saxena *et al.*, 2013).

Los glicolípidos comprenden varias clases importantes de compuestos tales como hormonas, edulcorantes, alcaloides, flavonoides, antibióticos, etc. Sin embargo, es casi imposible definir un patrón general de las actividades biológicas de los glicolípidos en comparación con sus respectivas agliconas (Kren y Martínková, 2001).

En general se acepta que los glicolípidos son más solubles en agua que las respectivas agliconas y que, por lo tanto, esta diferencia de hidrofobicidad tiene efecto sobre algunas propiedades

farmacocinéticas del compuesto, por ejemplo, la circulación, la eliminación y la concentración de este en los fluidos corporales. La modificación de la hidrofobicidad, sin embargo, influye principalmente en el transporte de membrana (Kren y Martíńková, 2001).

Se ha visto que algunos compuestos entran en las células sólo por su "solubilidad" en los componentes de la membrana. En el caso de los glicolípidos, a veces la glicosilación puede restringir o inhibir la captación celular del compuesto. La glicosilación puede influir fuertemente en el transporte a través de tales barreras importantes, como la barrera hematoencefálica, que bloquea la entrada de muchos compuestos en el tejido cerebral o la barrera placentaria, que bloquea la entrada e impide la intoxicación por metabolitos de xenobióticos del tejido fetal (Kren y Martíńková, 2001).

Sin embargo, existen algunos glicolípidos que pueden ser transportados activamente en el tejido a través del sistema de transporte de glucosa o por la interacción de algunos restos glicosídicos con receptores o lectinas encontradas sobre las superficies de las células (Kren y Martíńková, 2001).

Estudios realizados a este tipo de moléculas han demostrado que un glicósido aislado de *I. tricolor*, inhibe la actividad de los cloroplastos a nivel del fotosistema II, uniéndose a la plastoquinona B e inhibiendo de esta manera el flujo de electrones (León *et al.*, 2008); así mismo en un análisis realizado *in silico*, se pudo observar que, debido a la naturaleza de este tipo de moléculas, estas poseen la capacidad de insertarse en la membrana celular y debido a su tamaño, puede cubrir el ancho de esta (Achnine *et al.*, 1999); provocando su desestabilización. Finalmente, en otro estudio realizado en células Sf9 (células de *Spodoptera frugiperda*) se mostró, que este tipo de moléculas tienen la capacidad de incrementar la permeabilidad de la membrana tanto para cationes (K^+ y Na^+) como para aniones (Cl^-), lo cual sugiere la formación de poros (Rencurosi *et al.*, 2004).

La predicción de las actividades de glicoconjugados es determinada por su susceptibilidad a la escisión glicosídica en diferentes sitios de la molécula por medio de hidrólisis en sistemas vivos, sea por efecto de ácidos o enzimas (glicosidasas). Y, por tanto, la actividad biológica específica de algunos glicósidos no se deriva de la glicona o de la aglicona respectiva, sino que la actividad final se da por la estructura molecular global. Por lo que resulta farmacológicamente interesante el

establecer la correlación estructura-actividad para poder demostrar las ventajas o desventajas que generan las glicosilaciones en estas moléculas (Kren y Martínková, 2001).

1.2.3 *Ipomoea tyrianthina* Lindley

Ipomoea tyriantina (Fig. 2) es una especie muy polimorfa, que representa a una de las cuatro variedades encontradas de *Ipomoea orizabensis* (*I. orizabensis* var. *orizabensis*). Al igual que otras especies de *Ipomoea*, cuenta con varios nombres comunes, destacándose el de “hiedra”, “quiebraplato”, “manto de virgen”, “jalapa ligera”, “jalapa fusiforme”, “purgo macho”, “escamonea mexicana” y “cuamoclit”, entre otros (Carranza, 2007; Mirón *et al.*, 2007).

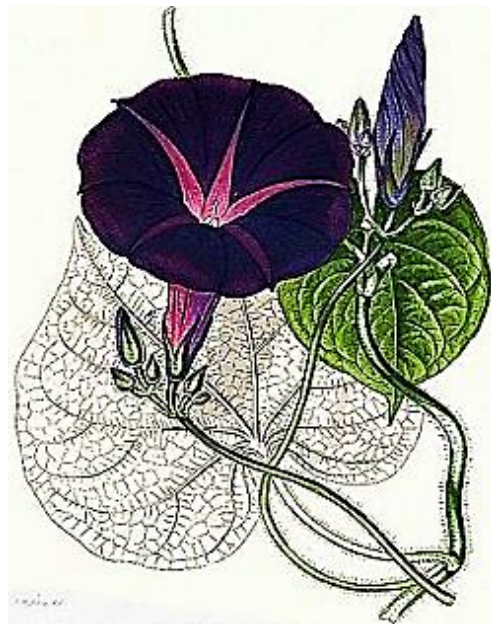


Figura 2. *Ipomoea tyrianthina* (www.classicnatureprints.com; Hernández *et al.*, 1999; Carranza, 2007).

1.2.3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica para este grupo de plantas representa un gran problema, debido a que varias especies de *Ipomoeas* muestran un alto polimorfismo a lo largo de su área de distribución. Por lo que podemos encontrar que una especie tenga varias sinonimias, e incluso tenga denominaciones

comunes diferentes de acuerdo con la región en la que se encuentre. A continuación, se muestra la clasificación taxonómica para *Ipomoea tyrianthina*:

Orden: Solanales

Familia: Convolvulaceae

Género: *Ipomoea*

Especie: *tyrianthina*

Nombre científico *Ipomoea tyrianthina* Lindley

Sinonimia *Ipomoea orizabensis* Pelletan Ledeb. ex Steud. var. *orizabensis*, *Convolvulus orizabensis* Pelletan, *Convolvulus superbus* Kunth, *Ipomoea superba* (Kunth) G. Don, *Pharbitis longepedunculata* M. Martens & Galeotti, *I. longepedunculata* (M. Martens y Galeotti) Hemsl.

1.2.3.2 Características botánicas y distribución geográfica

Ipomoea tyrianthina Lindley es una planta perenne, rastrera o trepadora, con una raíz tuberosa grande de hasta 20-40 cm de largo por hasta 10 cm de diámetro y resinosa; tallo de 2 a 3 mm de diámetro y varios metros de largo, ligniscente, pubescente a casi glabro; lámina foliar ovada y cordiforme, entera o 3 a 5-lobada, de 4 a 13 cm de largo, de 3 – 10 cm de ancho, glabra, ápice agudo o acuminado, mucronado, estrigosa o puberulenta en el haz y estrigosa o glabra en el envés; flores solitarias o dispuestas en cimas multifloras (2 a 5 flores) en las axilas de las hojas, pedúnculo primario de 10 a 21 cm de longitud, pedicelos de 0.5 a 2.5 cm de largo, glabros o pilosos; sépalos oblongo-lanceolados a ovado-elípticos; corola infundibuliforme, de color rosado-púrpura con el tubo blanco de 5 a 9 cm. de largo por 6 a 8.5 cm de diámetro, glabra o pubescente en los interpliegues; frutos subglobosos de 9 a 12 mm de largo por 7 a 10 mm de diámetro, de color café-pajiza oscuro, fina y densamente pubescentes; semillas elipsoides, de 5 a 6 mm de longitud, de color café claro, glabrescentes a puberulentas (Carranza, 2007).

Esta planta florece de julio a noviembre. Se encuentra ampliamente distribuida en gran parte del territorio nacional, identificándose principalmente en localidades como Cuautitlán de Iturbide a Iztapalapa, Milpa Alta, Texcoco y hasta Amecameca, extendiéndose desde Sinaloa y Nuevo León

hasta Guatemala (Fig. 3); a una altitud de 850 a 2750 msnm, comúnmente en zonas de pastizal, matorral xerófilo, en bosque tropical caducifolio, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino; formando parte de la vegetación ruderal o arvense (Tello, 2005; Carranza, 2007).



Figura 3. Distribución de *Ipomoea tyrianthina* en México y Centroamérica. Se reporta como maleza en Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Nayarit, Tlaxcala, Veracruz, y Guatemala (Villaseñor y Espinosa, 1998; Carranza, 2007).

1.2.3.3 Usos tradicionales y trabajos previos

Ipomoea tyrianthina forma parte del complejo de plantas correspondiente a la escamonea del viejo mundo. Dentro de la medicina tradicional mexicana, se utiliza como un sustituto y adulterante para los preparados a base de las raíces de *I. jalapa* Pursh e *I. purga* Hayne; siendo estas las más conocidas y valoradas en las farmacopeas europeas y latinoamericanas (Hernández, 1999). Con respecto a su propiedad purgante, esta especie ha sido considerada como la escamonea purgativa menos potente, de ahí su nombre común de "jalapa ligera". En la medicina tradicional se ha empleado como purgante y antihelmíntico; además de ser usada para tratar fiebre abdominal, disentería, epilepsia, hidrocefalia, "Manchas" (una infección de la piel por espiroquetas), meningitis y tumores (Hernández, 1999).

Se han descrito hasta el momento algunas características químicas de los compuestos encontrados en la resina de *Ipomoea tyrianthina*, así como de su actividad biológica. Se reportan que los glicolípidos

encontrados son compuestos derivados del ácido jalapινόlico y del ácido convolvulínico, y que su actividad biológica pudiera estar estrechamente relacionada con las características estructurales de su molécula. Dentro de las actividades que posee este grupo de compuestos encontramos la antidepresiva, relajante, hipnótica, neuroprotectora dependiente de la dosis, anticancerígena, antibacteriana y antiespasmódica, entre otras (Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009).

En varios trabajos de investigación realizados con la resina de *I. tyrianthina*, se han logrado aislar numerosos compuestos glicosídicos, que se cree que pudieran ser los responsables de las principales actividades biológicas atribuidas a los extractos realizados a partir de la raíz de esta planta. Dentro de aquellos glicolípidos más representativos, encontramos a las escamoninas, orizabinas, tiriantinas y ácidos tiriantínicos, entre otros (Tab. 7, Fig. 4).

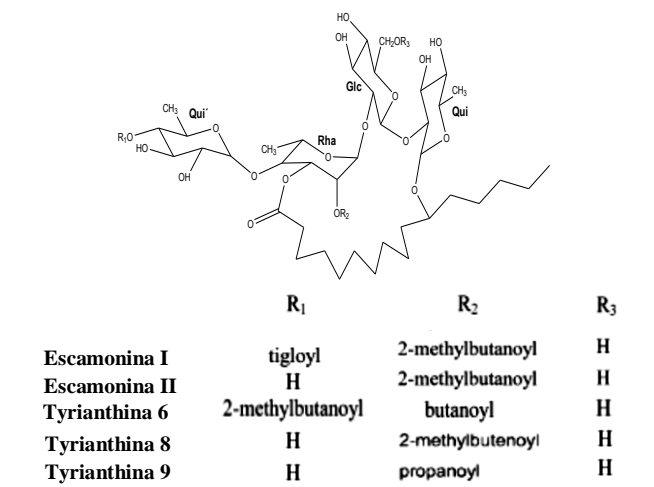
Se ha observado que la estructura química de algunos de estos compuestos es muy similar al de los glicolípidos aislados de otras especies de *Ipomoeas*. Con lo que se ha llegado a sugerir que existe una correlación biológica entre los efectos que tienen estos compuestos a nivel fisiológico y sus características estructurales, mediante la modificación de las interacciones de las biomoléculas con los receptores o mensajeros celulares (Mirón *et al.*, 2007). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de acción por el cual estos compuestos tienen su actividad biológica (Pereda y Bah, 2003; Mirón *et al.*, 2007).

Dentro de los glicolípidos que han mostrado tener algún tipo de actividad sobre el funcionamiento del sistema nervioso, se han destacado aquellos que pudieran modificar la liberación de neurotransmisores tales como GABA y ácido glutámico (Mirón, 2007; León *et al.*, 2008; Castro, 2011). En un trabajo previo, se observó que en ensayos *in vitro* en presencia del *tiriantina A* y *ácido tiriantínico VI* se ve incrementada la concentración de GABA endógeno liberado en el medio extracelular. Esto debido a que, posiblemente, *tiriantina A* modifica la actividad del transportador (bloqueándolo o activando su función reversa) o del receptor GABA_B (alterando el mecanismo de auto-regulación de la liberación de GABA); y que *ácido tiriantínico VI* probablemente altera la polaridad de membrana vía la activación de los canales de sodio o por la modificación en el funcionamiento del transportador de GABA (Castro, 2011).

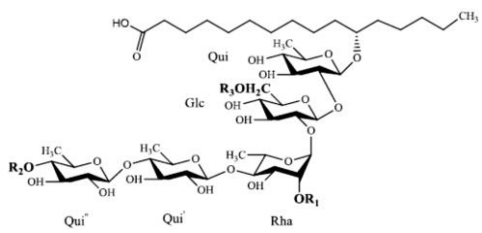
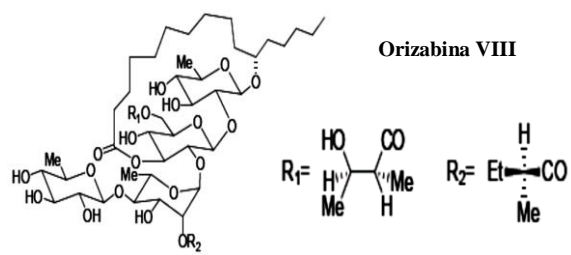
Tabla 7. Compuestos aislados de *Ipomoea tyrianthina*.

Glicolípido	Actividad biológica	Referencia
<i>Escamonina I</i>	Complejo glicolípido activo frente a <i>Staphylococcus</i> resistente a la meticilina.	Meira <i>et al.</i> , 2012
	Indujo una inhibición significativa del tono y la amplitud de las contracciones en el íleon de rata (efecto relajante y/o espasmolítico al 55.1%, dosis 250 µg/ml), la cual fue dependiente de la concentración y fue de menor potencia que la papaverina (control positivo).	Mirón <i>et al.</i> , 2007
	Mostró débil actividad contra células de carcinoma epidermoide oral (KB; ED ₅₀ 7-10 µg/ml).	Hernández <i>et al.</i> , 1999
	Mostró efecto anticonvulsivante y neuroprotector (100%) dosis-dependiente (40 mg/kg) en convulsiones inducidas por pentilene tetrazol.	Mirón <i>et al.</i> , 2007
<i>Escamonina II</i>	Glicolípido con débil actividad citotóxica (ED ₅₀ 4-20 µg/ml) contra el carcinoma epidermoide oral humano (KB).	Meira <i>et al.</i> , 2012; Hernández <i>et al.</i> , 1999
	Mostró efecto anticonvulsivante y neuroprotector (66%) dosis-dependiente (40 mg/kg) en convulsiones inducidas por pentilene tetrazol.	Mirón <i>et al.</i> , 2007
<i>Orizabinas I - IV</i>	Efecto laxante.	Meira <i>et al.</i> , 2012
<i>Orizabinas V - VII</i>	Glicolípidos con débil actividad citotóxica (ED ₅₀ 4-20 µg/ml) contra el carcinoma epidermoide oral humano (KB).	Meira <i>et al.</i> , 2012
<i>Orizabinas VIII</i>	Glicolípido que presenta débil actividad citotóxica débil contra el carcinoma de colon y carcinoma epidermoide oral humano (KB; ED ₅₀ 7-10 µg/ml).	Meira <i>et al.</i> , 2012
<i>Orizabinas IX - XXI</i>	Mostró actividad citotóxica (ED ₅₀ 1-5 µg/ml) contra el carcinoma epidermoide oral (KB) y actividad citotoxicidad débil contra carcinoma de colon (HCT-15), carcinoma de cérvix (SQC-1) y líneas celulares carcinoma de ovario (OVCAR) (ED ₅₀ 4-20 µg/ml).	Meira <i>et al.</i> , 2012; Hernández <i>et al.</i> , 1999
<i>Tiriantinas A y B</i>	Ambos glicolípidos mostraron un efecto <i>in vitro</i> relajante significativo en los anillos aórticos de rata.	León <i>et al.</i> , 2009; Meira <i>et al.</i> , 2012
	Son capaces de aumentar la liberación de GABA y ácido glutámico en la corteza cerebral.	
	Muestra una débil actividad antimicobacteriana.	

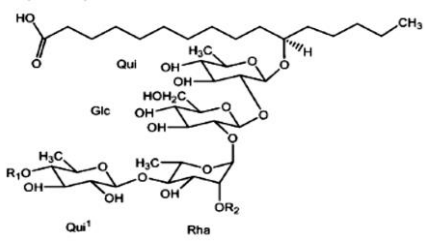
<i>Tiriantina 6</i>	Mostró efecto neuroprotector (88%) dosis-dependiente (40 mg/kg) en convulsiones inducidas por pentilinetetrazol.	Mirón <i>et al.</i> , 2007
	Indujo una inhibición significativa del tono y la amplitud de las contracciones en el íleon de rata (efecto relajante y/o espasmolítico al 59.1%, dosis 250 µg/ml), la cual fue dependiente de la concentración y fue de menor potencia que la papaverina (control positivo).	
	Mostró efecto antidepresor, reduciendo el tiempo de inmovilidad del ratón en la prueba de nado forzado a una dosis de 10 mg/kg.	
<i>Tiriantinas 8 y 9</i>	Muestra moderada actividad antimicobacteriana (MIC 25 µg/mL).	León <i>et al.</i> , 2008
	Actividad citotóxica contra líneas celulares de carcinoma epidermoide oral (KB; ED ₅₀ 2.2 y 2.5 µg/mL, respectivamente).	
	Mostraron efecto potenciador de hipnosis (10 mg/kg) inducido por pentobarbital, neuroprotector (70-100%) en convulsiones (40 mg/kg) inducidas por pentilinetetrazol, y aumentaron la liberación de GABA (dosis 4 µg/mL; máximo incremento a los 90 s) y ácido glutámico (dosis 4 µg/mL; incremento gradual de los 30 - 180 s) en la corteza cerebral (Modelo murino).	
<i>Ácidos tiriantínicos I y II</i>	Mostró que la moderada actividad contra <i>M. tuberculosis</i> (MIC 25 µg/mL).	León <i>et al.</i> , 2008
	Actividad citotóxica contra la línea celular KB (ED ₅₀ 2.6 y 2.8 µg/mL, respectivamente).	
	Mostraron efecto potenciador de hipnosis (10 mg/kg) inducido por pentobarbital, neuroprotector (70-100%) en convulsiones (40 mg/kg) inducidas por pentilinetetrazol, y aumentaron la liberación ácido glutámico (dosis 4 µg/mL; incremento gradual de los 30 - 180 s) en la corteza cerebral (Modelo murino).	
<i>Tiriantinas C, D y E</i>	Muestran efecto neuroprotector del 31.2, 28.3 y 26.9% (80 mg/kg), respectivamente, frente a la mortalidad causada por PTZ; sin embargo, no previenen la aparición de convulsiones, sino que su administración a dosis de 20, 40 y 80 mg/kg aumenta el tiempo de latencia y potencia el efecto hipnótico del pentobarbital (30 mg/kg), por lo que presenta efecto sedante. Producen un aumento gradual en la liberación de GABA a partir de los 120 s (dosis 10 µg/mL) y parece no producir la liberación de ácido glutámico (dosis 10 µg/mL) en la corteza cerebral (Modelo murino).	León <i>et al.</i> , 2014
	Mostró bajo efecto vaso-relajante sobre endotelio aórtico dosis dependiente, y por tanto, efecto vasodilatador. Mostró efecto vasoconstrictor a dosis altas.	
<i>Ácidos tiriantínicos III, IV, V y VI</i>	Sin efecto neuroprotector, relajante o sedante.	León <i>et al.</i> , 2014



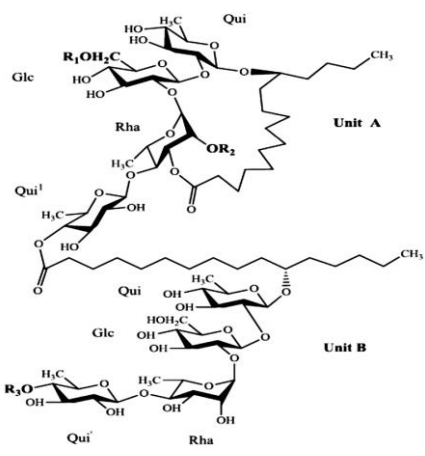
	R ₁	R ₂	R ₃
Escamonina I	tigloyl	2-methylbutanoyl	H
Escamonina II	H	2-methylbutanoyl	H
Tyrianthina 6	2-methylbutanoyl	butanoyl	H
Tyrianthina 8	H	2-methylbutenoyl	H
Tyrianthina 9	H	propanoyl	H



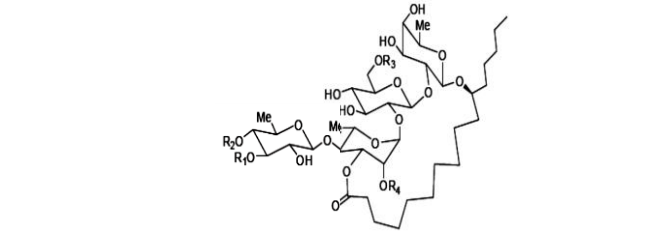
	R ₁	R ₂	R ₃
A. tyrianthinoico	H	H	H
A. tyrianthinoico III	mba	niloyl	H
A. tyrianthinoico IV	mba	H	niloyl
A. tyrianthinoico V	mba	niloyl	niloyl



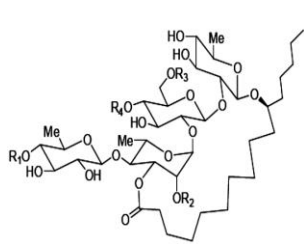
	R ₁	R ₂
Á. tyrianthinoico I	2-methyl-3-hydroxybutanoyl	2-methylbutanoyl
Á. tyrianthinoico II	2-methylbutenoyl	2-methylbutanoyl
A. tyrianthinoico VI	niloyl	H



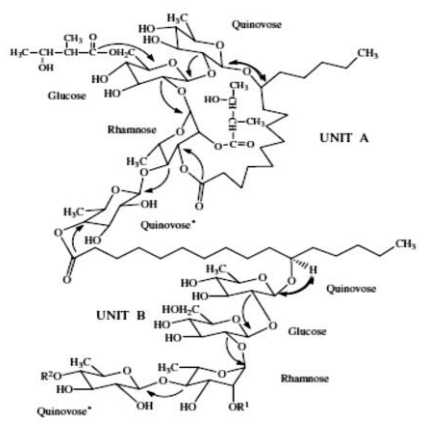
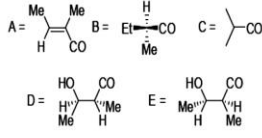
	R ₁	R ₂	R ₃
Tyrianthina C	niloyl	mba	H
Tyrianthina D	H	mba	tigloyl
Tyrianthina E	niloyl	mba	tigloyl



	R ₁	R ₂	R ₃
Orizabina I	H	α-methyl-butanoyl	2-methyl-3-hydroxy-butanoyl
Orizabina II	H	isobutanoyl	2-methyl-3-hydroxy-butanoyl
Orizabina III	H	2-methyl-3-hydroxy-butanoyl	2-methyl-3-hydroxy-butanoyl
Orizabina IV	isobutanoyl	H	2-methyl-3-hydroxy-butanoyl



Orizabina V	R ₁ =D; R ₂ =B; R ₃ =R ₄ =H
Orizabina VI	R ₁ =R ₄ =H; R ₂ =D; R ₃ =B
Orizabina VII	R ₁ =R ₄ =H; R ₂ =B; R ₃ =D
Orizabina IX	R ₁ =A; R ₂ =B; R ₃ =H; R ₄ =D
Orizabina X	R ₁ =A; R ₂ =D; R ₃ =C; R ₄ =H
Orizabina XI	R ₁ =A; R ₂ =E; R ₃ =C; R ₄ =H
Orizabina XII	R ₁ =A; R ₂ =C; R ₃ =D; R ₄ =H
Orizabina XIII	R ₁ =A; R ₂ =C; R ₃ =E; R ₄ =H
Orizabina XIV	R ₁ =A; R ₂ =D; R ₃ =B; R ₄ =H
Orizabina XV	R ₁ =A; R ₂ =E; R ₃ =B; R ₄ =H
Orizabina XVI	R ₁ =A; R ₂ =B; R ₃ =D; R ₄ =H
Orizabina XVII	R ₁ =A; R ₂ =B; R ₃ =E; R ₄ =H
Orizabina XVIII	R ₁ =B; R ₂ =D; R ₃ =B; R ₄ =H
Orizabina XIX	R ₁ =B; R ₂ =E; R ₃ =B; R ₄ =H
Orizabina XX	R ₁ =B; R ₂ =B; R ₃ =D; R ₄ =H
Orizabina XXI	R ₁ =B; R ₂ =B; R ₃ =E; R ₄ =H



	R ₁	R ₂
Tyrianthina A	niloyl	2-methylbutanoyl
Tyrianthina B	H	butanoyl

Figura 4. Estructuras de compuestos aislados de *Ipomoea tyrianthina*.

Por su parte, *escamonina I* ha mostrado tener un efecto neuroprotector y anticonvulsivo; y *tirianatina C* muestra actividad neuroprotectora baja y con efecto en la liberación de GABA. Sin embargo, no se ha estudiado su mecanismo de acción, en donde posiblemente al igual que *tirianatina A* y *ácido tiriantínico VI*, se afecten los mecanismos de neurotransmisión GABAérgicos o que puedan atravesar e iniciar cascadas de señalización vía segundos mensajeros a nivel de membrana celular; activando el flujo del calcio contenido en los depósitos intracelulares tales como el retículo endoplásmico y/o mitocondrias (Sandor *et al.*, 1989) y teniendo como consecuencia un incremento en la concentración de calcio intracelular que estimula la fusión vesicular y la liberación del neurotransmisor en la hendidura sináptica.

Si bien hemos destacado la importancia del estudio de las propiedades y/o actividad biológica de los compuestos presentes en las resinas extraídas de *Ipomoea tyrianthina*, la cual radica en su potencial aplicación en el área médica y farmacéutica, aun no son claros sus mecanismos de acción o blancos moleculares a nivel celular.

El conocimiento del efecto que pudieran tener este tipo de compuestos puros sobre el sistema nervioso, y principalmente de aquellos que alteren la neurotransmisión GABAérgica, se podrá aplicar para la formulación de nuevos fitofármacos con acción neuroprotectora en el tratamiento de enfermedades de tipo neurodegenerativo o que modifican los procesos de neurotransmisión, tales como la epilepsia; por lo que podrían tener un mayor efecto neuroprotector ante estados convulsivos relacionados con enfermedades neurodegenerativas y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Debido a la similitud estructural y la actividad biológica que tienen *escamonina I* y *tirianatina C* con respecto a otros compuestos encontrados en *Ipomoea tyrianthina*, se plantea en este trabajo establecer el mecanismo por el cual pudieran tener efecto sobre la concentración de GABA en ensayos *in vitro* y su posible relación con la actividad neuroprotectora y/o anticonvulsiva que se le atribuye a esta planta.

1.3 Justificación

Cerca de 450 millones de personas en el mundo sufren enfermedades neurológicas, cuyo afecto a la población general representa importantes repercusiones socioeconómicas. En México, la epilepsia es la primera causa de atención en consulta neurológica, seguida de trastornos de ansiedad, depresión y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer; aumentando la morbilidad, mortalidad y discapacidad asociada a estas enfermedades del SNC en los últimos años (Corona *et al.*, 2002; SINAVE/DGE/SALUD, 2012). Esta problemática y la falta de tratamientos efectivos para aquellas enfermedades neurológicas ha llevado a una intensa búsqueda de nuevos fármacos para el desarrollo de terapias alternativas (Saxena *et al.*, 2013).

Estudios recientes han reportado que algunos glicolípidos obtenidos de las resinas producidas por plantas del género *Ipomoea* poseen actividad anticonvulsiva y/o neuroprotectora. Además, por su fácil catabolismo, posiblemente producirían menos efectos secundarios no deseados; y cuya producción biotecnológica representaría costos menores con respecto a la de los fármacos sintéticos usados actualmente. Por lo que el uso de compuestos o extractos naturales obtenidos a partir de estas plantas pudiera llegar a ser una buena alternativa terapéutica, por su posible efecto neuroprotector.

Por todo lo anterior, resulta importante conocer más acerca del mecanismo por el cual estos compuestos pudieran tener efecto sobre la neurotransmisión, la regulación GABAérgica y su relación con la actividad neuroprotectora que se le atribuyen a *Ipomoea tyrianthina*. Además de ayudar a establecer las bases farmacológicas para su uso como agentes alternativos en el tratamiento de trastornos convulsivos y/o neurodegenerativos.

1.4 Hipótesis

- El efecto neuroprotector que tienen *escamonina I* y *tyrianthina C* sobre el sistema nervioso está relacionado con los mecanismos de transmisión GABAérgica.

1.5 Objetivo general

- Determinar el posible mecanismo por el cual *escamonina 1* y *tiriantina C* pudieran tener efecto sobre la concentración de GABA y relacionarlo con las actividades neuroprotectora y anticonvulsiva atribuidas a *Ipomoea tyrianthina*.

1.5.2 Objetivos particulares

- Aislar *escamonina 1* y *tiriantina C* a partir de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*.
- Determinar el efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la liberación de GABA.
- Evaluar el efecto anticonvulsivo y neuroprotector de *escamonina 1* y *tiriantina C*.

1.6 Estrategia experimental general

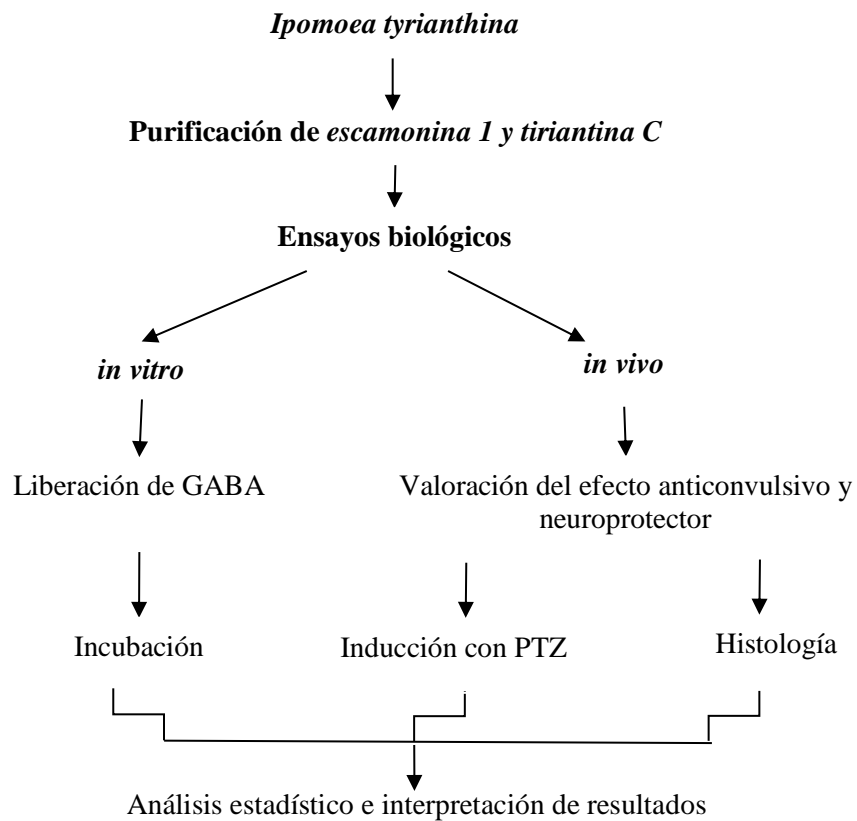


Figura 5. Diagrama experimental.

Capítulo 2 : Purificación de los glicolípidos

2.1 Generalidades

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, varios de los glicolípidos aislados de plantas pertenecientes al género *Ipomoea* han presentado diferentes actividades biológicas; por lo que el estudio fitoquímico de las resinas glicosídicas ha ido en aumento en los últimos años.

Debido a que las resinas glicosídicas son una mezcla compleja de moléculas anfipáticas que generalmente son de alto peso molecular, la separación de sus componentes ha constituido un gran reto debido a la similitud estructural de sus constituyentes. Esta similitud estructural se debe a la existencia de estructuras isoméricas, que se diferencian en las posiciones de lactonización y de esterificación, así como variaciones en la secuencia de glicosilación del oligosacárido (Mirón, 2007).

Como ya se mencionó, la estructura química de los glicolípidos presentes en estas resinas consiste en una cadena oligosacárida (glicona) unida glicosídicamente a un ácido graso mono o dihidroxilado de 14 o 16 átomos de carbono (aglicona). Generalmente, los glicolípidos poseen un anillo de macrolactona que abarca dos o más unidades de la cadena principal de oligosacárido. Por lo que, el empleo de técnicas cromatográficas analíticas ha permitido realizar la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas, mejorando la eficiencia y resolución en los protocolos de purificación de este tipo de metabolitos.

Con respecto a la elucidación estructural de las resinas glicosídicas, se han enfocado en conocer el número total de unidades de monosacáridos, la identidad de los monosacáridos, su configuración anomérica, el sitio de unión de los monosacáridos y la posición y tipo de sustituyentes unidos a los sacáridos. Para ello, el estudio estructural de oligosacáridos y glicósidos mediante RMN, utilizando experimentos de una (^1H y ^{13}C) y dos dimensiones (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HSQC, y HMBC) han sido un éxito en los últimos años, ya que esta técnica permite caracterizar cada uno de los átomos que conforman a las moléculas. Además, las técnicas de espectrometría de masas (FAB y ESI) y EM-MALDI-TOF complementan dicho estudio estructural, debido a que proporcionan información precisa y exacta del peso molecular de estos metabolitos.

De acuerdo con algunos autores, los glicolípidos han sido clasificados en dos grupos en base a su solubilidad: 1) jalapina (soluble en éter y cloroformo) y convolvulina (insoluble en éter y soluble en metanol). El grupo jalapina comparte la estructura común de un anillo de macrolactona compuesto por un ácido glicosídico acilado. Los miembros del grupo convolvulina poseen pesos moleculares más grandes, lo que podría ser un resultado de ser oligómeros de ácidos glicosídicos (Pereda *et al.*, 2006; Pereda *et al.*, 2010). Los glicolípidos utilizados en este trabajo, *escamonina 1* y *tiriantina C*, se aislaron de la jalapina y convolvulina de la raíz de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*, respectivamente.

2.2 Objetivo particular

- Aislar *escamonina 1* y *tiriantina C* a partir del extracto metanólico de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Material vegetal y extractos de raíz de *Ipomoea tyrianthina*

Se partieron de extractos vegetales realizados previamente de las raíces de plantas de *Ipomoea thyrianthina* (Anexo A: 1) colectadas en dos regiones diferentes del centro de la República Mexicana: en el Municipio de Ahuazotepec del Estado de Puebla (agosto de 2000 y diciembre de 2002) y en el Municipio de Cuernavaca del Estado de Morelos (diciembre de 20004 y agosto de 2005). La clasificación e identificación botánica fue realizada por el biólogo M. Castro, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Un ejemplar de *Ipomoea thyrianthina* de cada recolección fue depositado en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (vales IMSS-15073, IMSS-15004, IMSS-15077 e IMSS-15076, respectivamente).

2.3.2 Obtención de las resinas glicosídicas

2.3.2.1 *Escamonina 1*

El compuesto *escamonina 1* se purificó a partir del fraccionamiento primario del extracto de diclorometano (jalapina) de la raíz de las plantas colectadas de *Ipomoea tyrianthina* (Anexo A: 2.1)

de acuerdo con Mirón *et al.* (2007). *Escamonina 1* fue proporcionada por el Dr. Ismael León Rivera (Fig. 6), del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM).

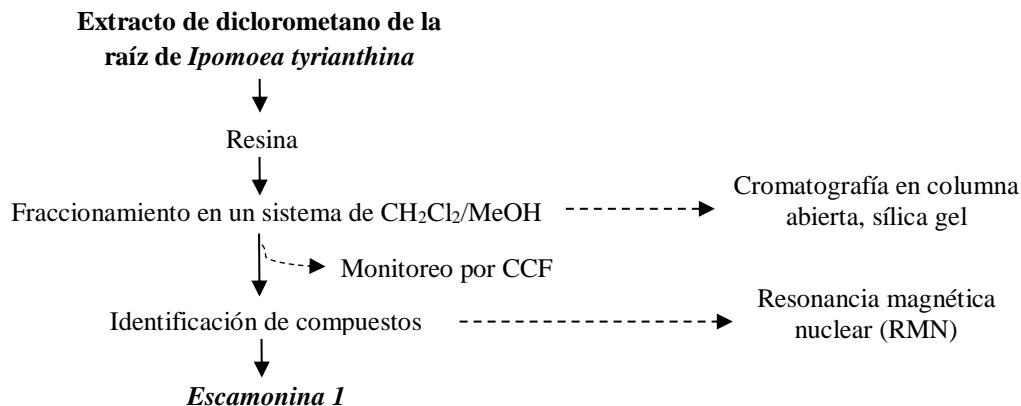


Figura 6. Esquema de purificación de *escamonina 1*.

2.3.2.2 *Tiriantina C*

Para el aislamiento de *tiriantina C* se realizó a partir del extracto metanólico (convolvulina) de la raíz de las plantas colectadas de *Ipomoea tyrianthina* (Anexo A: 2.2) de acuerdo con Mirón *et al.* (2007) y León *et al.* (2014), el cual fue proporcionado por el Dr. Ismael León Rivera (Fig. 7).

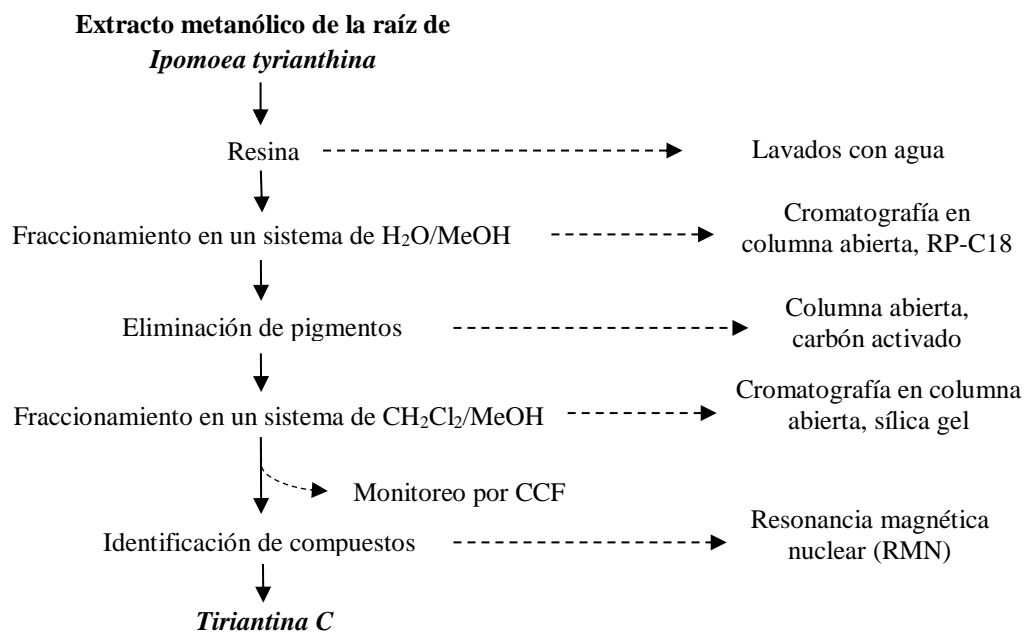


Figura 7. Esquema de purificación de *tiriantina C*.

2.3.3 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas

La identificación de *escamonina 1* y *tiriantina C* fue realizada por el Dr. Ismael León Rivera, por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM).

Se elucidaron las estructuras moleculares por resonancia magnética nuclear (RMN) uni y bidimensional, espectrometría de masas (ionización por electrospray o ESI, y por bombardeo de átomos acelerados en su modalidad positiva o FAB positivo y modalidad negativa o FAB negativo) para determinar la información estructural a partir de la fragmentación, de acuerdo con lo publicado por Mirón *et al.* (2007) y León *et al.* (2014). Las muestras fueron sometidas a hidrolisis y posteriormente analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para determinar la naturaleza y secuencia de los azúcares presentes en el núcleo oligosacárido, así como del tipo de ácidos carboxílicos de cadena corta que los esterifican.

2.4 Resultados

2.4.1 Escamonina 1

A partir de la jalapina de las raíces de *Ipomoea tyrianthina* y su fraccionamiento, fueron proporcionados 154.35 mg de un polvo amorfo blanco por el Dr. Ismael León Rivera.

De acuerdo con los datos obtenidos de su análisis químico y con lo obtenido por Mirón (2007), el compuesto aislado tiene un punto de fusión de 130-134 °C, HRFABMS $[M - H]^-$ $m/z = 1019.5422$ (calculado para $C_{50}H_{83}O_{21}$, 1019.5426) y RF=0.31.

El análisis de RMN reveló que se trata de una molécula de tipo macrocíclica del ácido 11-hidroxidecanoico unido a un tetrasacárido (quinovosa-glucosa-ramnosa-quinovosa), al que los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular derivados del ácido butanoico (R_1 =tigloilo, R_2 =2-metilbutanoilo, R_3 =H) se encuentran como sustituyentes en las unidades de monosacárido (Fig. 8).

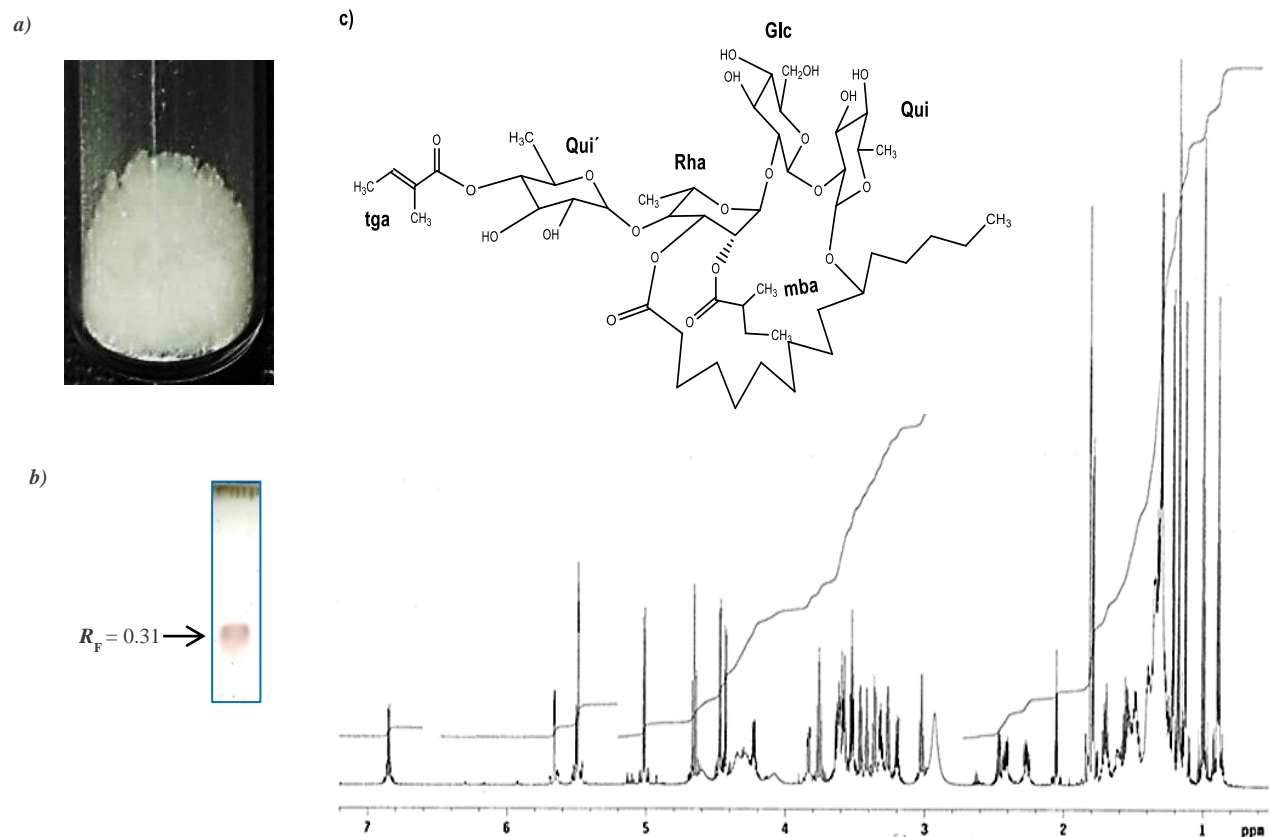


Figura 8. Escamonina 1. a) Aspecto físico, b) CCF, y c) espectro de RMN 1H y estructura química (mba = 2-metilbutanoilo, tga = tigloilo, Qui = quinovosa, Glc = glucosa, Rha =

La comparación de estos datos espectrales con los valores publicados, concuerdan con la resina glicosídica identificada como *escamonina 1* (Noda *et al.*, 1990). La macrolactona que muestra este compuesto, posee la misma estructura a las reportadas para el caso de *I. stans* e *I. orizabensis* (Mirón, 2007).

2.4.2 Tiriantina C

La separación de *Tiriantina C* se hizo a partir de un extracto metanólico obtenido de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*, el cual fue proporcionado por el Dr. Ismael León Rivera. Inicialmente, se realizaron lavados con agua destilada para extraer los compuestos de naturaleza no glicosídica, obteniéndose 9 gramos de la resina (convolvulina) que contenían al analito de interés (Fig. 9).

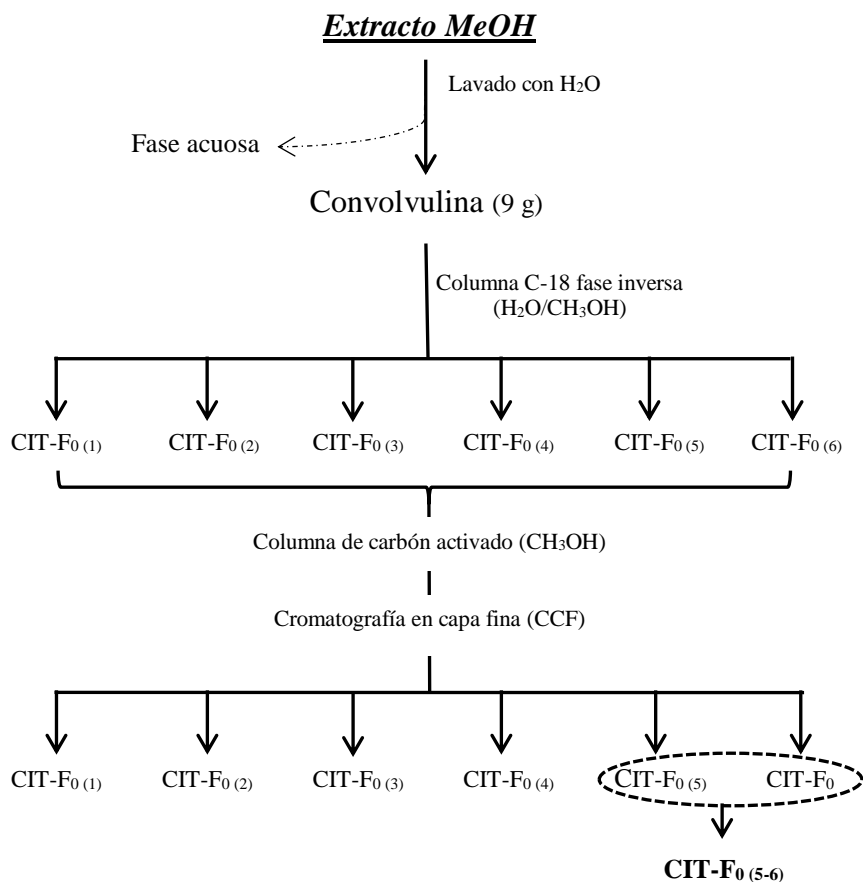


Figura 9. Obtención y fraccionamiento de la convolvulina.

La convolvulina de *Ipomoea tyrianthina* (CIT) fue fraccionada por medio de cromatografía de columna abierta empacada con una fase estacionaria de dimetiloctadecilsilano (C-18) y eluida con una fase móvil compuesta con H₂O/CH₃OH (fase inversa) en diferentes proporciones, de lo cual se obtuvieron seis fracciones (CIT-F₀(1-6)).

Posteriormente, con la finalidad de evitar interferencias durante el monitoreo de las fracciones por medio de CCF, se pasó cada fracción por una columna empacada con una fase estacionaria de carbón activado para eliminar los pigmentos contenidos en cada una de ellas.

De acuerdo a los patrones de la CCF, se reunieron las fracciones 5 y 6 (CIT-F₀(5-6)=5.8586 gramos), y se volvieron a fraccionar mediante el uso de cromatografía de columna abierta empacada con una fase estacionaria de sílica gel y eluida con una fase móvil compuesta con CH₂Cl₂/CH₃OH en diferentes proporciones (Fig. 10). De esta separación se obtuvieron 12 fracciones (CIT-F₁(1-12)), las cuales fueron de nuevo monitoreadas por medio CCF.

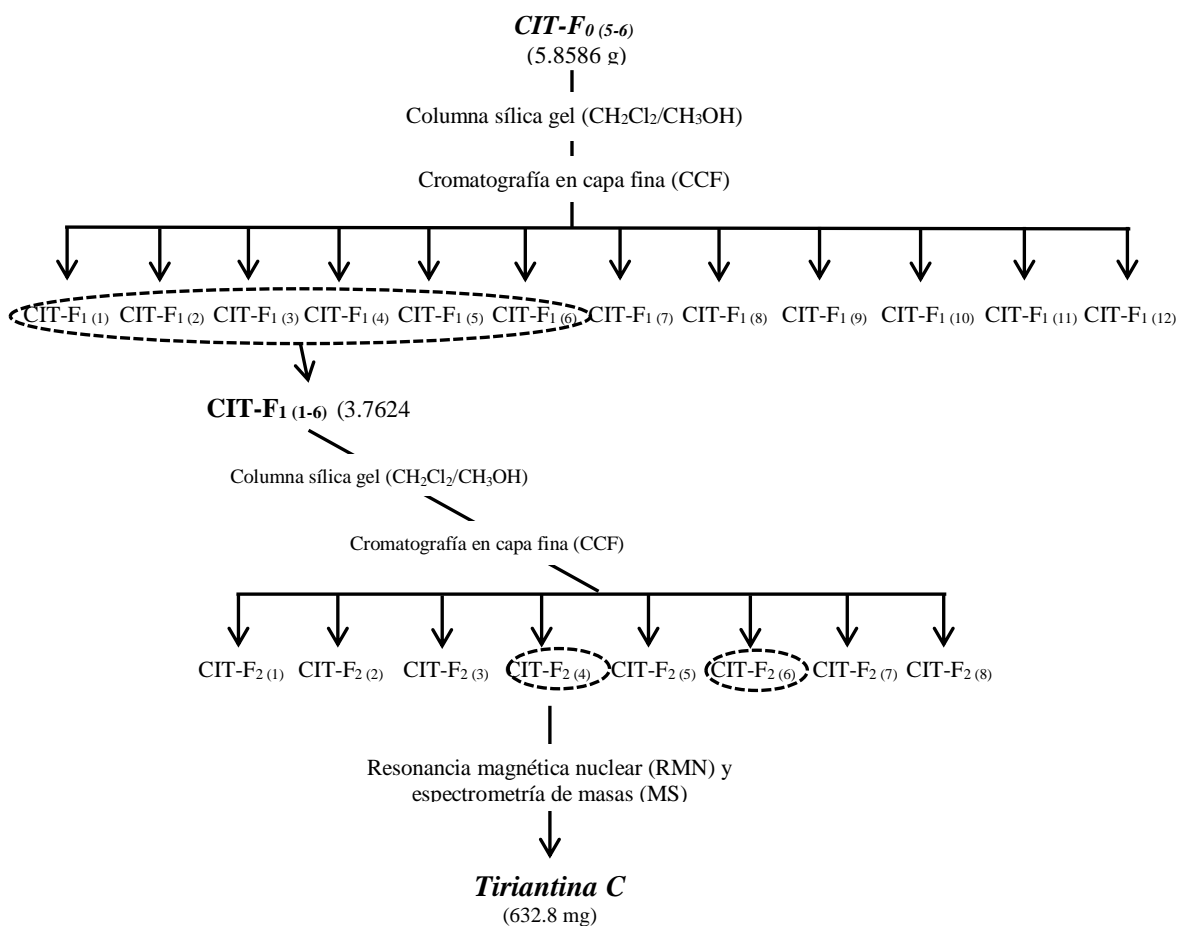


Figura 10. Diagrama general de purificación de *tiriantina C*.

Luego se reunieron las fracciones 1-6 ($CIT-F_1(1-6) = 3.7624$ gramos) y se volvieron a fraccionar, de igual manera por cromatografía de columna abierta empacada con una fase estacionaria de sílica gel y eluida con una fase móvil compuesta con CH₂Cl₂/CH₃OH en proporciones 100:0, 99:01, 98:02, 97:03, 96:04, 95:05, 94:06, 93:07, 92:08, 91:09, 90:10, 89:11, 88:12, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, 20:80, y 0:100. De esta separación se obtuvieron 8 fracciones ($CIT-F_2(1-8)$), que de igual manera fueron monitoreadas por medio de CCF; de las cuales se identificaron a las fracciones 4 y 6 como compuestos puros, $CIT-F_2(4)$ y $CIT-F_2(6)$ respectivamente.

$CIT-F_2(4)$ corresponde al compuesto mayoritario soluble en CH₃OH. De este compuesto fueron obtenidos 632.8 mg de un sólido amorfo, cuya caracterización química fue realizada por el Dr. Ismael León Rivera.

De acuerdo con lo publicado por León *et al.* (2014), el compuesto aislado tiene un punto de fusión de 137-139 °C, HRFABMS $[M - H]^-$ $m/z = 1891$ (calculado para $C_{90}H_{156}O_{41}$, 1893.0122) y $R_F=0.53$. El análisis de RMN (Fig. 11) reveló que se trata de una molécula de tipo dimérico, cuya unidad A tiene una estructura macrocíclica del ácido 11-hidroxidecanoico unido a un tetrasacárido (quinovosa-glucosa-ramnosa-quinovosa), y la unidad B de un derivado del ácido escamónico. Las esterificaciones presentes son ácidos carboxílicos de bajo peso molecular derivados del ácido butanoico ($R_1=$ *niloilo*, $R_2=2$ -metilbutanoilo, $R_3=H$).

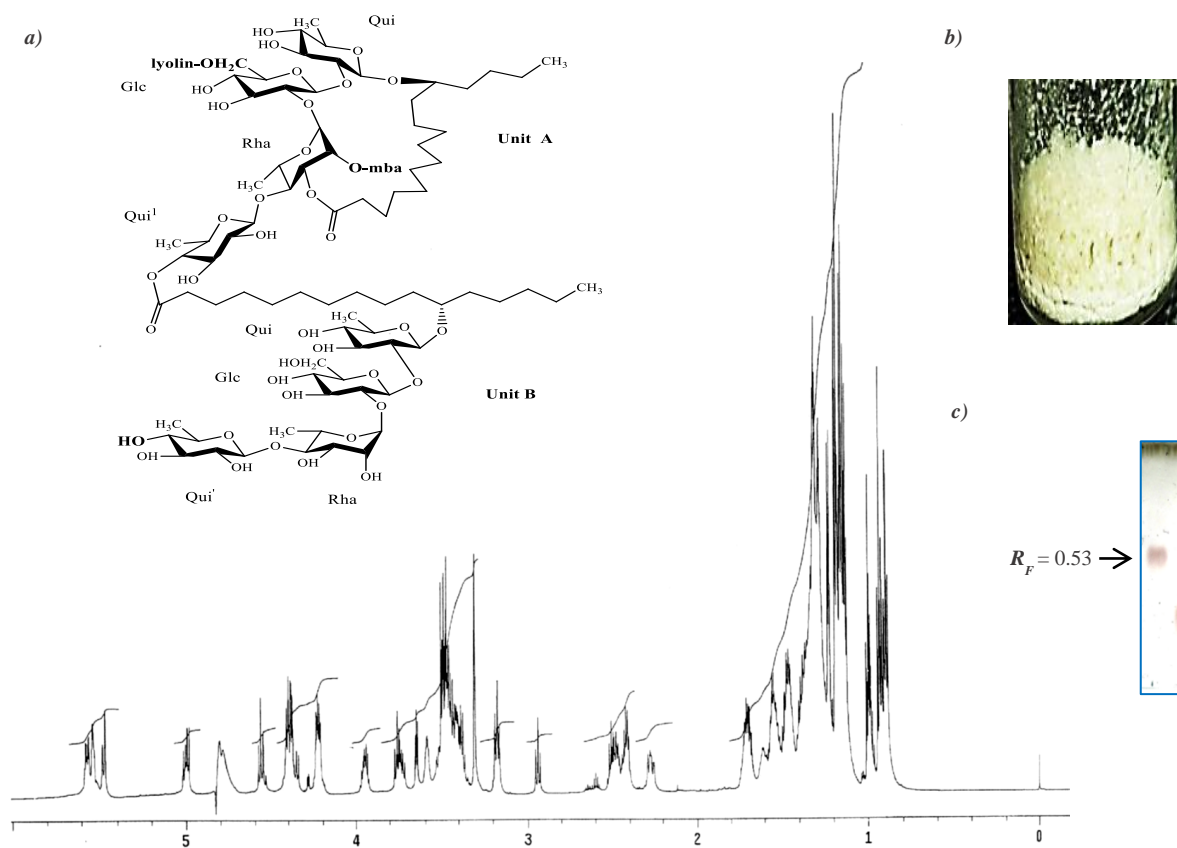


Figura 11. Tiriantina C. a) Espectro de RMN 1H y estructura química ($R_1 =$ tiglioilo, $R_2 = 2$ -metilbutanoilo, $R_3 = H$); b) aspecto físico, y c) CCF.

Éste compuesto se denominó *tiriantina C* (León *et al.*, 2014), y muestra estructura similar a las reportadas anteriormente para el caso de heterodímeros *tiriantina A* y *B*, aislados de *I. tyrianthina* (León *et al.*, 2009; Meira *et al.*, 2012).

2.5 Discusión

El estudio de aquellos compuestos presentes en las resinas glicosídicas ha tomado importancia no sólo debido a la actividad biológica que muestran éstas, sino por su posible aplicación en el área médica como nuevos agentes terapéuticos. Por lo que el aislamiento de nuevos compuestos glicosídicos bioactivos pudiera permitir sentar las bases para sustentar su producción a nivel biotecnológico, tal y como ha sucedido con la producción de otros metabolitos secundarios.

El aislamiento de glicolípidos monoméricos provenientes de resinas producidas por convolvuláceas, como la *escamonina 1*, ha sido descrita ampliamente. Sin embargo, hasta hace algunos años, el número de reportes fitoquímicos acerca del aislamiento de glicolípidos tipo dimérico en Convolvuláceas era reducido, debido a lo difícil que resulta su aislamiento e identificación.

Estas moléculas contienen dos unidades de glicolípido, siendo una de las entidades monoméricas la macrolactona y la segunda en forma de ácido glicosídico. El primer reporte de glicolípidos diméricos tipo éster fue el de la merremina, aislada de *Merremia hungaiensis*, este compuesto consiste en dos unidades de este glicolípido, la teguajalapina X. Para la caracterización estructural de éste dímero, se realizó hidrólisis ácida y posterior metilación para obtener los ésteres metílicos del ácido palmítico y el ácido operculínico A, los cuales fueron analizados por RMN-¹H y ¹³C (Noda *et al.*, 1995; Mirón, 2007).

Con respecto al aislamiento de *tiriantina C*, este resultó ser un metabolito de difícil aislamiento al igual que muchos otros glicolípidos encontrados en las resinas glicosídicas de *Ipomoea tyrianthina*. Sin embargo, la previa eliminación de los azúcares y pigmentos presentes en la convolvulina de *Ipomoea tyrianthina* ayudó a optimizar el proceso de fraccionamiento de las muestras por CCA y su monitoreo por CCF. La caracterización química de *tiriantina C* a través del uso de RMN y EM, confirmó que era un compuesto perteneciente a un grupo de compuestos bien definidos presentes en la convolvulina de *Ipomoea tyrianthina*, tales como *tiriantina A* y *B* (León *et al.*, 2009; Meira *et al.*, 2012).

Este tipo de moléculas se caracterizan por ser moléculas tipo éster derivados del *ácido escamónico* A, con estructura heterodimérica conformados por una subunidad macrolactonizada y otra abierta; y que, además, se les han atribuido actividad sobre sistema nervioso y en particular sobre la liberación de GABA en corteza cerebral de ratón.

2.6 Conclusiones

- Se aislaron a *escamonina 1* y *tiriantina C* de la jalapina y la convolvulina de *Ipomoea tyrianthina*, respectivamente.
- *Tiriantina C* es un glucósido heterodímero de reporte nuevo para *Ipomoea tyrianthina*.

Capítulo 3 : Efecto de escamonina 1 y tirinatina C sobre el sistema GABAérgico

3.1 Sistema nervioso: generalidades y neurotransmisión GABAérgica

3.1.1 Sistema nervioso y neurotransmisión

Al sistema nervioso lo conocemos como un conjunto de elementos relacionados con la recepción de los estímulos, la transmisión de los impulsos nerviosos y la activación de los mecanismos motores en los músculos. El sistema nervioso humano consta de cientos de miles de millones de neuronas, cada una de las cuales recibe y emite decenas de miles de conexiones (Kandel, 2001; Porres *et al.*, 2010).

La organización del sistema nervioso en la naturaleza (Fig. 12) se representa en distintos grados de complejidad estructural, desde redes ganglionares simples hasta su disposición más centralizada formada por un cerebro y una red de nervios.

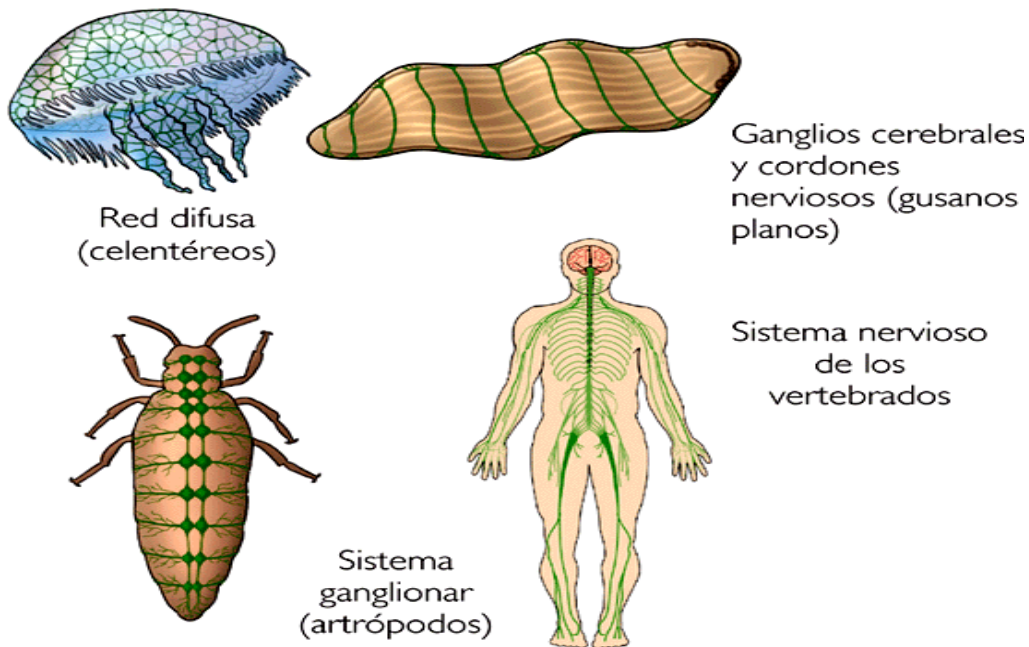


Figura 12. Disposición y organización del sistema nervioso en distintos organismos (www.kalipedia.com).

El sistema nervioso tiene dos componentes diferenciados anatómicamente: sistema nervioso central (compuesto del encéfalo y la médula espinal) y el sistema nervioso periférico (ganglios y nervios periféricos); y a nivel histológico, se encuentra constituido principalmente por dos grupos celulares: las células gliales (glía) y las células nerviosas (neuronas) (Kandel, 2001; Haines, 2003).

Las *células gliales* (Fig. 13) son elementos satélites de las neuronas que rodean a los cuerpos neuronales, los axones y las dendritas, sin tener una participación directa en la generación o recepción de los impulsos nerviosos. Este grupo celular se encuentra entre 10 y 50 veces más abundante que las neuronas en el sistema nervioso central de los vertebrados (Kandel, 2001).

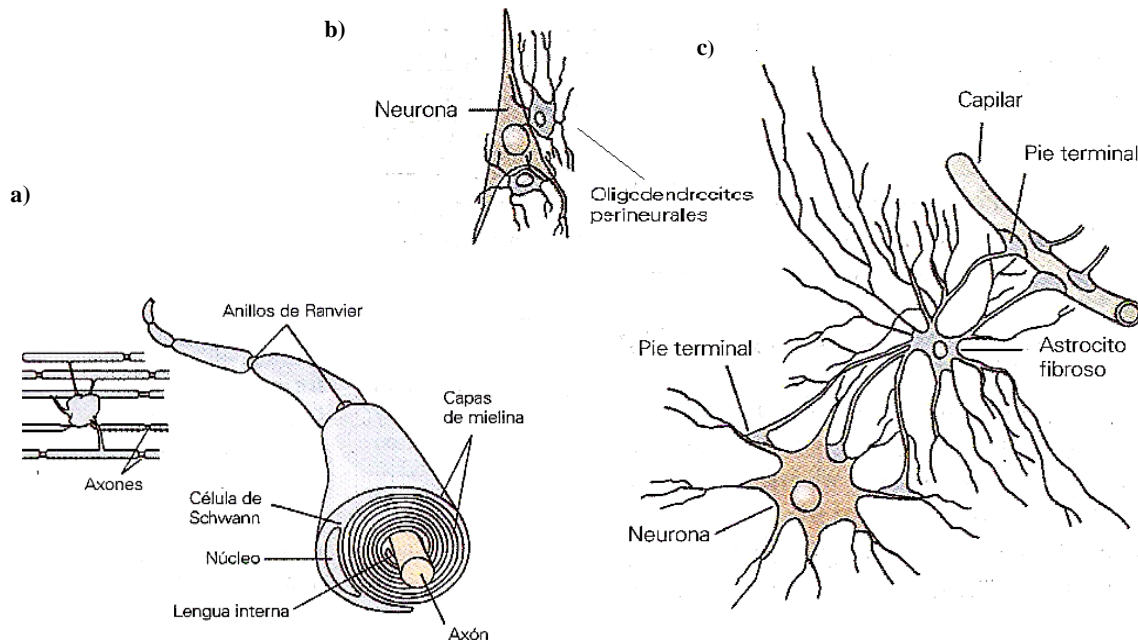


Figura 13. Células gliales: estructura y representación de algunas funciones. Se representan: a) células de Schwann encargadas de la producción de mielina, rodeando a los axones y dando lugar a los nódulos de Ranvier; b) oligodendrocitos rodeando el soma de una neurona, dando sostén; y c) astrocito encontrado entre una neurona y un capilar, regulando el paso de nutrientes y formando parte de la barrera

Las células gliales se dividen en dos tipos principales: macroglía (*oligodendrocitos, células de Schwann, astrocitos*) y microglía (fagocitos); y dentro de sus principales funciones se encuentran las de brindar sostén y estructura al tejido nervioso, eliminación de toxinas y detritos, regulación sináptica, regular el transporte de nutrientes a las neuronas, formar la barrera hematoencefálica (*astrocitos*), encargarse de la producción de la mielina que envuelve regiones del axón neuronal

(*oligodendrocitos* y *células de Schwann*) y de protección (células fagocíticas de la *microglía*) (Longstaff, 2000; Kandel, 2001; Haines, 2003).

Las **neuronas** (Fig. 14) son células de respuesta específica que recogen, transforman y transmiten la información de otras neuronas (desde las dendritas al soma y de éste al axón) o directamente de su entorno, de forma precisa, rápida y a larga distancia con otras células (Haines, 2003). De estas posibles rutas, la información sensitiva es captada y transmitida por las neuronas sensitivas primarias, en las que se incluyen a los fotorreceptores, los quimiorreceptores, los mecanorreceptores, los termorreceptores y los nocirreceptores.

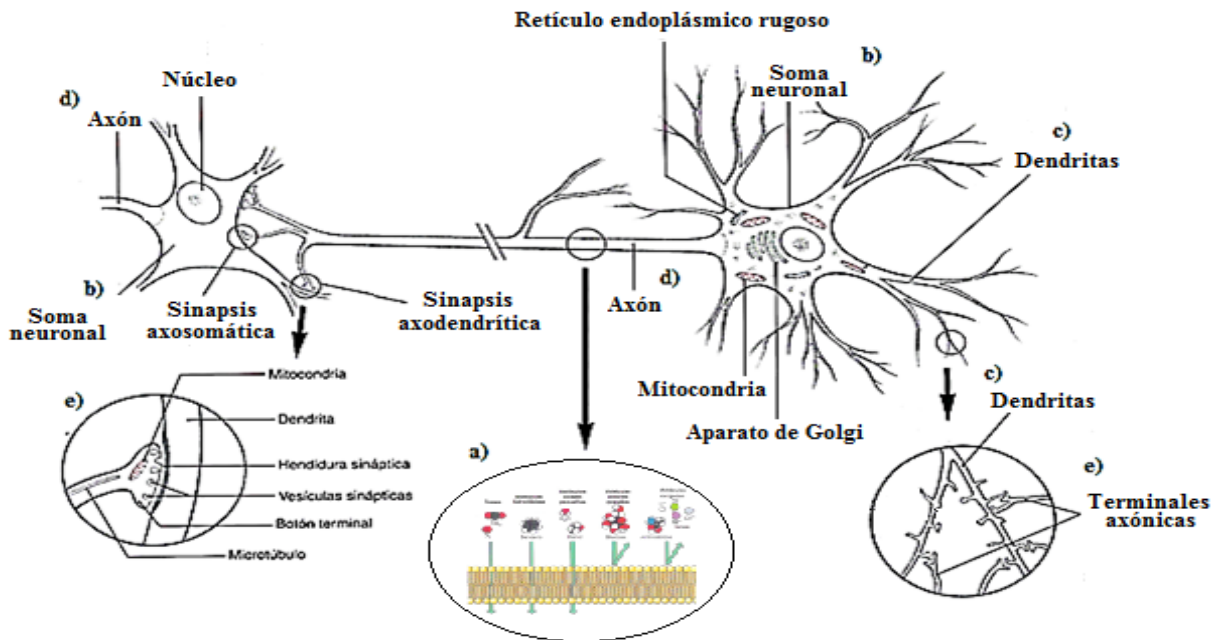


Figura 14. La neurona: características estructurales. Se observa la estructura típica de una neurona: a) membrana; b) soma; c) dendritas; d) axón; y Terminales axónicas (modificada del Haines, 2003).

En todos estos casos, la recepción de la información esta mediada por sinapsis, que es el lugar en el que una prolongación de una neurona (normalmente, la terminal axónica) se comunica o transfiere información a una segunda neurona o a una célula efectora (glandular o muscular) a través del impulso nervioso. En general, existen dos tipos de sinapsis o mecanismos desde el punto de vista morfológico por los cuales se da la neurotransmisión (Longstaff, 2000; Haines, 2003): 1) la sinapsis eléctrica-eléctrica (Fig. 15a) y 2) la sinapsis eléctrica-química (Fig. 15b).

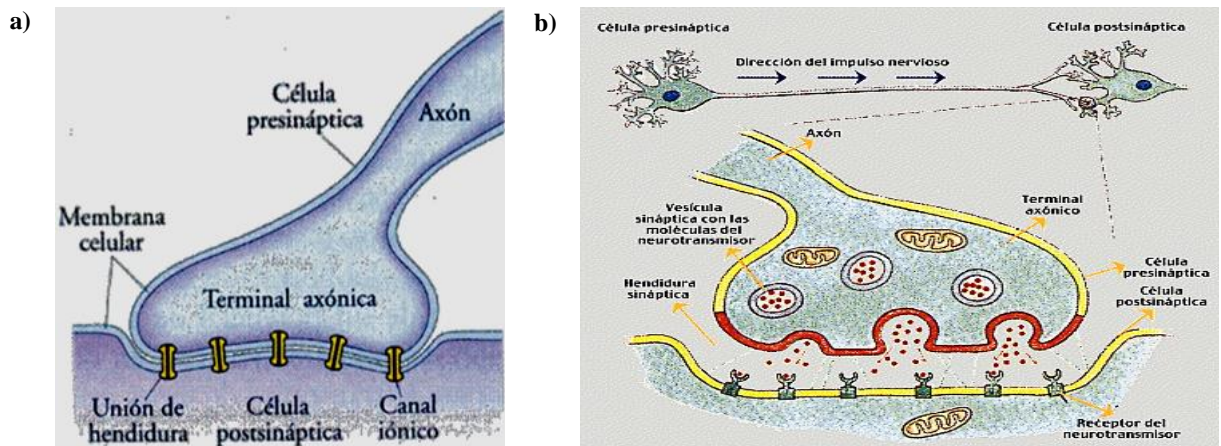


Figura 15. Modelo funcional, estructural y espacial de los tipos de sinapsis. **a)** Sinapsis eléctrica-eléctrica: se ilustra la disposición de las conexinas y uniones gap a lo largo de la membrana, brindando continuidad al medio interno entre una y otra célula; y **b)** Sinapsis eléctrica-química: se ilustra la disposición de la sinapsis, en la que se involucra la liberación de un neurotransmisor vía vesicular hacia la hendidura sináptica, y su posterior unión a su receptor específico (www.biologiacelularb.com.ar).

La sinapsis eléctrica-eléctrica es la menos común en mamíferos, aunque es la encargada de la respuesta rápida, basándose en la variación de voltaje en una membrana en reposo producida por un estímulo; y la sinapsis eléctrica-química que es la más común en mamíferos, siendo el principal mecanismo por el cual se da la transmisión nerviosa, pueden o no estar ligadas a mecanismos de transducción de señales en los que intervienen segundos mensajeros (p. ej., proteína G) e implica la liberación del neurotransmisor (de un tipo o varios) tras la llegada del potencial de acción a la terminal nerviosa (Longstaff, 2000; Haines, 2003).

3.1.2 Sistema de transmisión GABAérgica

El ácido γ -aminobutírico o GABA fue identificado desde hace más de 50 años en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, y después en el cerebro humano (Wood *et al.*, 2000). La mayoría de las sinapsis de tipo GABAérgico se localizan en interneuronas de las cortezas cerebral y cerebelar; están estrechamente relacionadas con el control motor y representan la principal fuente de inhibición en SNC (aproximadamente el 40% de todas las neuronas), asegurando la función normal del cerebro al contrarrestar e integrar la actividad excitadora (Siegel *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2000; Benke *et al.*, 2002).

GABA puede tener diferentes orígenes (neuronal y glial), y su *síntesis de novo* se lleva principalmente a partir del neurotransmisor excitador L-glutámico vía descarboxilación, en la cual participa la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en presencia de fosfato de piridoxal (proveniente de la vitamina B₆ como co-factor) o la GABA aminotransferasa. Su efecto inhibitorio se basa en la respuesta de hiperpolarización que produce a nivel postsináptico, debido a un aumento en la conductancia del cloruro de la membrana neuronal, permitiendo el flujo de estos iones a favor de su gradiente electroquímico en la célula (Martin y Dunn, 2002).

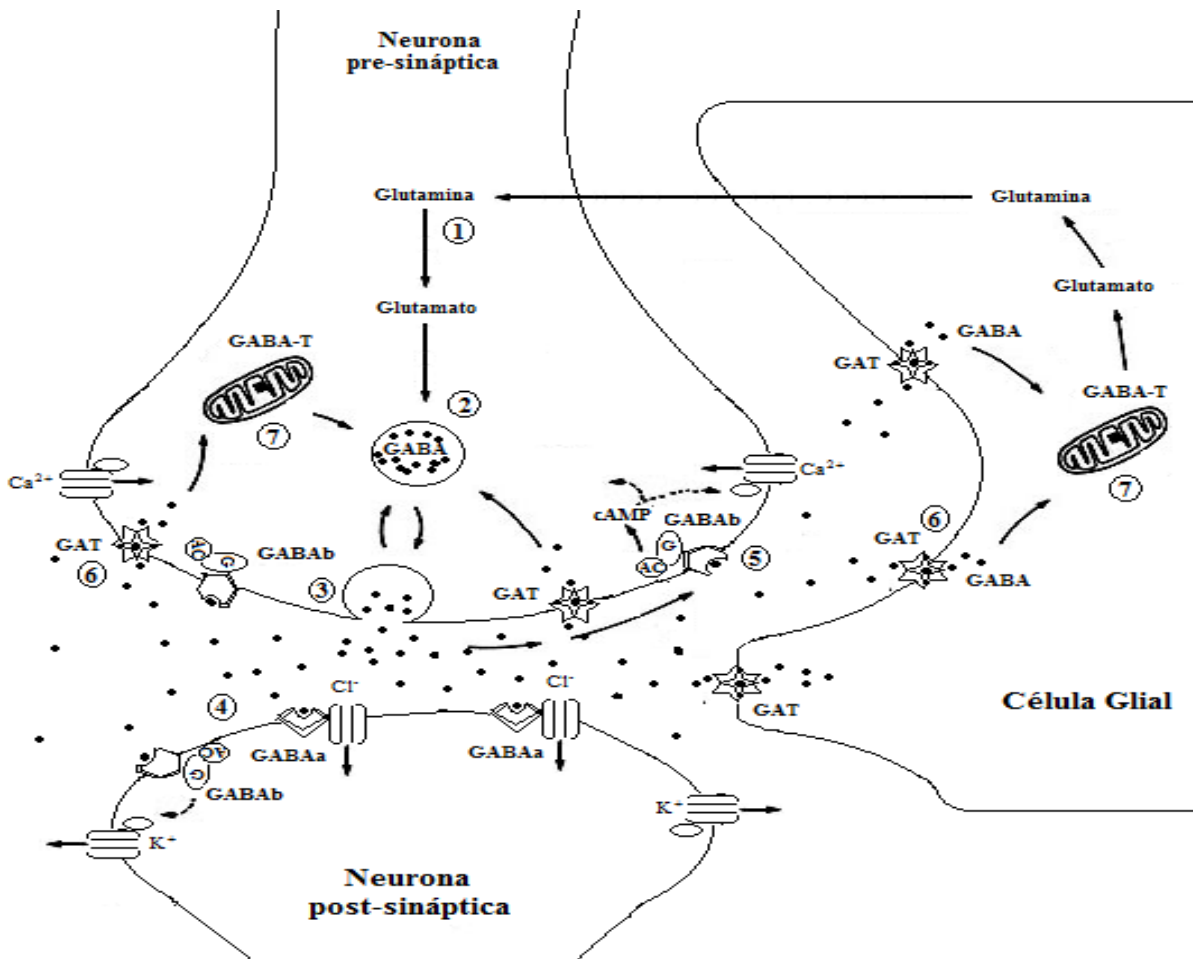


Figura 16. Sinapsis GABAérgica. 1) Síntesis de GABA a partir del glutamato por acción de la glutamato descarboxilasa (GAD); 2) transporte y almacenamiento de GABA; 3) liberación de GABA por exocitosis; 4) unión de GABA a sus receptores post-sinápticos (GABA_A, GABA_B ligada a una proteína G y/o cAMP a canales de K⁺ y Ca²⁺; 5) unión de GABA a sus receptores pre-sinápticos; 6) recaptura de GABA por la terminal pre-sináptica y captura de GABA por la glía; 7) catálisis de GABA vía transaminación a α-cetoglutarato por acción de la GABA transaminasa (GABA-T), regenerando el glutamato y la glutamina; la glutamina glial es reimportada a la neurona.

Actualmente se sabe que la función de la sinapsis GABAérgica está integrada por distintos procesos (Fig. 16), tales como la síntesis de GABA por acción de la enzima glutamato Descarboxilasa (GAD), la actividad inhibitoria asociada al receptor ionotrópico GABA_A, los procesos de auto-regulación asociados a los receptores metabotrópicos GABA_B, la recaptura/captura de GABA asociada a la función del transportador GAT en la neurona pre-sináptica/glía, la degradación enzimática de GABA asociada a la función de la enzima GABA-Transaminasa (GABA-T), y la actividad de canales iónicos.

Entre sus posibles implicaciones funcionales, se cree que la alteración de tipo GABAérgica se encuentra relacionada con algunos trastornos neuropsiquiátricos, tales como las crisis convulsivas (epilepsia), procesos de tipo coordinador o integrador en relación con procesos motores y cognitivos, así como en trastornos neurológicos y psiquiátricos importantes, como puede ser el caso de la corea de Huntington, la disquinesia tardía, el alcoholismo, la esquizofrenia, los trastornos del sueño, el autismo y la enfermedad de Parkinson (Solís *et al.*, 2007; Luján, 2004; Teixidor y Masson, 1997). Además, cumple un papel importante en los procesos de neuroprotección ante estímulos excitotóxicos (Kumar y Khanum, 2012).

3.1.3 Excitotoxicidad y la función GABAérgica

Actualmente, existe un amplio interés en la aplicación de sustancias neuroprotectoras para prevenir y tratar enfermedades del sistema nervioso central. Algunos de los agentes neuroprotectores que se han identificado actúan sobre la actividad excitotóxica evocada tras un evento de daño neuronal.

En este caso, el deterioro neuronal genera una disminución de la concentración de ATP que causa la falla de las bombas iónicas de la membrana permitiendo la entrada de iones sodio, calcio y cloro y la salida del potasio. Esto despolariza la célula y activa receptores de kainato, quisqualato y NMDA los que a su vez producen apertura de canales de sodio y cloro y liberación de aminoácidos excitatorios (glutamato), los cuales aumentan aún más la entrada de calcio extracelular a la célula permitiendo la salida de calcio mitocondrial con el consiguiente mayor aumento de calcio intracelular.

La expresión de la neurotoxicidad causada por la hipercalcemia intracelular es la última fase de la lesión neuronal, en la que se produce la degeneración de los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y la disrupción de las membranas celulares, fenómenos íntimamente relacionados con la liberación y acción de los radicales libres, y que llevan a activar los procesos de muerte celular programada.

A nivel terapéutico, para contrarrestar el efecto de la actividad excitotóxica se ha llevado a cabo el uso de agentes bloqueadores del receptor del ácido glutámico, antagonistas de los receptores NMDA o agonistas de los receptores de GABA. Sin embargo, a nivel fisiológico existen mecanismos de neuroprotección intrínsecos, dentro los cuales se ve involucrada la actividad GABAérgica.

La actividad neuroprotectora GABAérgica inicia casi de forma inmediata tras el evento de daño neuronal, en donde el glutamato y GABA son acumulados rápidamente en el espacio intercelular. El incremento en la concentración de GABA aumenta la inhibición sináptica y contrarresta la excitotoxicidad producida por el glutamato. También se observa un aumento en la expresión y actividad de los receptores GABAérgicos ($GABA_A$), así como de la disminución de la expresión y actividad de la glutamato-descarboxilasa (GAD). Por lo que se ha propuesto que aquellos agentes que promueven el aumento en la concentración de GABA, evitando su degradación o activando su síntesis, son candidatos potenciales como fármacos neuroprotectores.

3.2 Objetivos particulares

- Establecer si *escamonina I* y *tiriantina C* tienen efecto sobre la liberación *in vitro* de GABA endógeno.
- Evaluar si el efecto sobre la liberación *in vitro* de GABA endógeno en presencia de *escamonina I* y *tiriantina C* es dependiente de la concentración de Na^+ y Ca^{2+} extracelular.
- Estudiar el efecto de *escamonina I* y *tiriantina C* sobre el mecanismo de recaptura de GABA y la actividad del receptor $GABA_B$.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Animales

Como modelo experimental se utilizaron ratones hembra adultos (*Mus musculus*) de la cepa CD1 (20-30 gramos) para la disección y obtención de las rebanadas de la corteza cerebral. Los especímenes fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas en el bioterio hasta antes de su utilización. El protocolo de manejo de los animales en el laboratorio se realizó siguiendo los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

3.3.2 Evaluación farmacológica

3.3.2.1 Preparación de las rebanadas de corteza cerebral

Los ratones que se utilizaron en los ensayos de liberación fueron sacrificados por dislocación cervical para proceder con la disección del cerebro sobre una placa con hielo triturado. Posteriormente, una vez extraído el cerebro, se obtuvieron manualmente las rebanadas de la corteza (250-300 μm) con una navaja de rasurar y un cubreobjetos de guía (Gutiérrez y Delgado, 1989; Abarca, 2000).

Las rebanadas obtenidas de corteza cerebral (500 - 600 μg c/u) fueron colocadas en un vial previamente adicionado con 2 ml de buffer Krebs-Ringer modificado (medio basal) (Anexo C), a pH de 7.4 y a una temperatura de 4°C en constante aireación hasta su utilización en los ensayos de liberación (por no más de 5 minutos). Fue adicionado ácido aminoxiacético (AAO) al medio para evitar el metabolismo de GABA.

3.3.2.2 Ensayos de liberación de GABA

Una vez realizada la disección, se aclimataron las rebanadas de corteza de cerebro de ratón en un vial con medio basal (Krebs-Ringer modificado) durante 10 minutos en constante aireación a 37 °C, simulando las condiciones fisiológicas basales del tejido. Los ensayos *in vitro* de liberación de GABA (Anexo B) se llevaron a cabo usando un sistema de incubación y aeración (Gutiérrez y Delgado, 1989; Abarca, 2000; Castro, 2011).

Transcurrido el periodo de aclimatación, los tejidos fueron colocados en viales con 2.0 ml de medio basal en constante aireación a 37 °C, y se prepararon las condiciones de trabajo: control y experimentales (Tab.8).

Tabla 8. Condiciones control y experimentales para los ensayos *in vitro* de liberación de GABA.

<p><u>Condiciones control:</u></p> <p>H₂O/MeOH + Basal (control negativo): 4.7 mM KCl. H₂O/MeOH + Alto potasio (control positivo): 47.0 mM KCl.</p>
<p><u>Condiciones experimentales:</u></p> <p>Cloruro de colina 118 mM (ausencia de sodio). EGTA 100 μM (ausencia de calcio). Guvacina 100 μM (inhibidor de recaptura). 2-Hidroxisaclofen 100 μM (antagonista del receptor GABA_B).</p>

Los ensayos control valorarán las condiciones sin estímulo (basales) y con estímulo (medio de alto potasio – KCl 47.0 mM) en presencia de H₂O/MeOH. Las condiciones experimentales se prepararon de la misma forma que los ensayos basales, pero adicionando la *escamonina I* y *tiriantina C* a una concentración de 10 y 20 μg/ml. Estos ensayos permitirán evaluar de forma general el efecto de *escamonina I* y *tiriantina C* sobre el sistema GABAérgico, utilizando:

- a) Cloruro de colina en lugar de cloruro de sodio (Sitges y Galindo, 2005), lo que permitirá evaluar si el efecto de *escamonina I* y *tiriantina C* es dependiente la concentración de sodio extracelular;
- b) Ethylene Glycol-bis (β-Aminomethyl-Ether) o EGTA (Sitges y Galindo, 2005), para determinar si el efecto de *escamonina I* y *tiriantina C* es dependiente de la concentración de calcio extracelular;

- c) Guvacina (inhibidor de GAT), para determinar si escamonina I y tiriantina C afectan el mecanismo de recaptura de GABA; y
- d) 2-Hidroxisaclofen (antagonista del receptor GABA_B), para valorar si escamonina I y tiriantina C afectan la función del receptor GABA_B.

Una vez preparadas las condiciones, se agitaron los viales e inmediatamente comenzó a correr el tiempo de ensayo. Se tomó de cada vial una alícuota inicial de 200 µl al tiempo 0 (condiciones iniciales o basales), posteriormente se adicionaron los compuestos (*escamonina I* o *tiriantina C*) y se repitió la toma de alícuotas de 200 µl a diferentes tiempos (30, 60, 90, 120, 180 y 300 segundos). *Escamonina I* o *tiriantina C* fueron evaluados a las concentraciones de 10 y 20 µg/ml.

3.3.2.3 Cuantificación de GABA

Una vez finalizados los ensayos de liberación, las alícuotas colectadas se mantuvieron en refrigeración hasta la cuantificación del GABA presente en cada una de ellas, la cual se llevó a cabo por medio de un análisis cromatográfico (Anexo D), haciendo una previa derivatización de la muestra con O-ftaldialdehído (OPA) de acuerdo con Jones y Gilligan (1983).

Las rebanadas de corteza de cerebro de ratón utilizadas en cada condición experimental se homogenizaron en 1 ml de agua destilada (50 r.p.m. por 2 minutos) para la cuantificación del contenido de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) con ayuda de una curva estándar de BSA (albúmina de suero de bovino).

Finalmente, la concentración de GABA de cada muestra se normalizó con respecto al contenido de proteína y cambios de volumen para cada caso. Los resultados se reportaron como *picomolas* de neurotransmisor endógeno liberado por microgramo de proteína obtenida (*pmol / µg de proteína*).

3.3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos de liberación de GABA fueron analizados usando la plataforma estadística GraphPad Prism (Prism 6 para Windows versión 6.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA), bajo las pruebas de ANOVA de 1 vía y de t-Student. Para ello, se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$, expresando los datos como la media \pm error estándar ($\bar{X} \pm SEM$).

3.4 Resultados

Como se sabe, los mensajeros químicos liberados durante la neurotransmisión son pequeñas moléculas que comunican a las neuronas con otras neuronas o células diana, cuya función varía de acuerdo con la naturaleza de su molécula y se libera selectivamente de una terminación nerviosa por el efecto de un potencial de acción (Cooper, 2007).

El efecto inhibitorio que ejerce GABA, se basa en la respuesta de hiperpolarización que produce a nivel postsináptico, debido a un aumento en la conductancia del cloruro de la membrana neuronal, asegurando la función normal del cerebro al contrarrestar e integrar la actividad excitadora (Longstaff, 2000; Martin y Dunn, 2002).

3.4.1 Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la concentración de GABA endógeno liberado.

En la actualidad existen una gran variedad de fármacos que tienen como objetivo el actuar sobre el SNC, esto es modificando los procesos de neurotransmisión. Ejemplo de estos, son aquellos compuestos de origen natural que al parecer afectan el funcionamiento de tipo inhibitorio (GABAérgico), aumentando la concentración de GABA o potenciando su efecto, por lo cual se cree que sean buenos agentes neuroprotectores frente a la excitotoxicidad mostrada en algunos trastornos neurológicos.

Controles

Las condiciones control de los ensayos *in vitro*, control negativo (CN) y control positivo (CP), muestran las tendencias que presentaron las concentraciones de GABA en un periodo de tiempo que va de 0 a 300 segundos, en ausencia de *escamonina I* y *tiriantina C*, pero en presencia del solvente de las muestras (H₂O/CH₃OH, 50:50). El “CN” muestra las condiciones que se asemejan a los parámetros fisiológicos normales en los que se encuentra el tejido, es decir, en ausencia de estímulo. En la figura 17, se observa el comportamiento que tiene la liberación basal de GABA, manteniendo una concentración de entre 0.044 – 0.085 pmol/ml µg de proteína a lo largo del experimento.

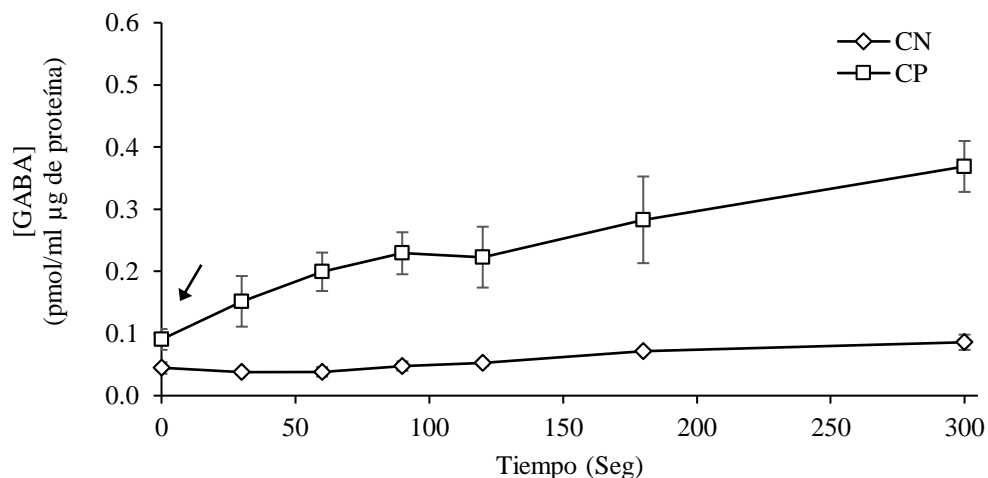


Figura 17. Liberación de GABA: condiciones control. La gráfica muestra la liberación de GABA endógeno ($\mu\text{mol/ml } \mu\text{g de proteína}$) en medio basal para el control negativo (CN, 4.7 mM KCl) y en medio con alto potasio para el control positivo (CP, 47 mM KCl), durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó el medio con alto potasio para CP. Se colectaron alícuotas de 200 μl a diferentes tiempos y se cuantificó la concentración de GABA. De cada muestra se tomaron 20 μl que se inyectaron en el HPLC, previa derivatización con OPA. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

Por otro lado, “CP” muestra la tendencia de liberación de GABA en presencia de un estímulo con respecto al tiempo (Fig. 17). En este caso, el estímulo que produce la despolarización de las células está dado por una alta concentración de potasio en el medio de incubación (47 mM KCl) que, en comparación con el control negativo, contiene 10 veces más la concentración de potasio que en condiciones fisiológicas normales, y que tiene como efecto la liberación del neurotransmisor. En “CP” la concentración de GABA mantuvo un crecimiento gradual significativo con respecto a “CN” a lo largo del experimento, observándose la máxima concentración de GABA a los 300 segundos de estar en presencia del estímulo (0.368 $\mu\text{mol/ml } \mu\text{g de proteína}$), con respecto a la concentración inicial (0.090 $\mu\text{mol/ml } \mu\text{g de proteína}$).

Escamonina I y tiriantina C.

La actividad terapéutica que tienen algunos metabolitos secundarios sobre sistema nervioso se ha atribuido al efecto de estos sobre la concentración de los neurotransmisores liberados, como es el caso de *escamonina I* y *tiriantina C* sobre la liberación de GABA.

En los ensayos de liberación, *escamonina 1* (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) produjo un incremento progresivo sobre la concentración de GABA endógeno liberado a lo largo del ensayo, el cual fue significativamente mayor en comparación con el comportamiento de “CN”. Donde las máximas concentraciones del neurotransmisor se mostraron a los 300 segundos (0.302 y 0.285 $\text{pmol} / \text{ml} \mu\text{g}$ de proteína para la dosis de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) (Fig. 18).

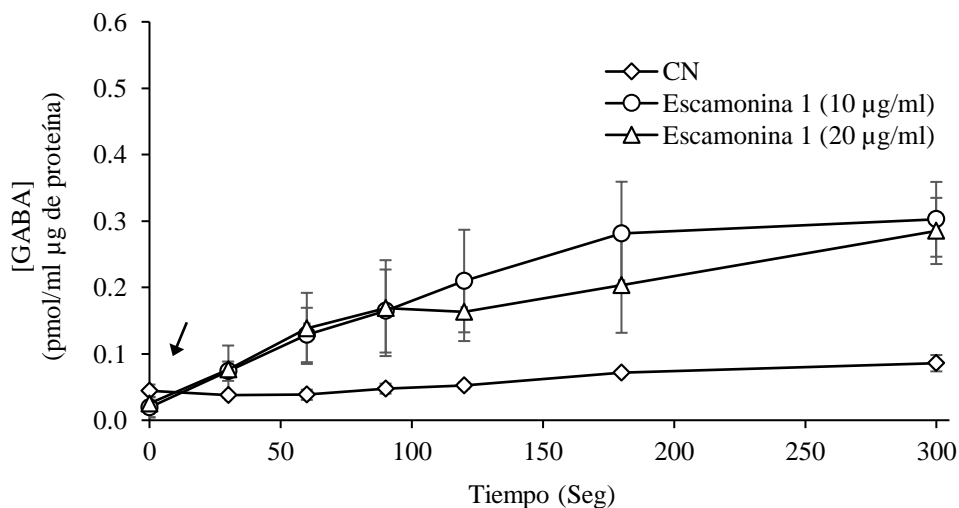


Figura 18. Liberación de GABA en medio basal en presencia de escamonina 1. La gráfica muestra el efecto que tienen dos concentraciones de *escamonina 1* (10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre la concentración de GABA ($\text{pmol/ml} \mu\text{g}$ de proteína) durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó *escamonina 1*. Se colectaron alícuotas de 200 μl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 μl que se inyectaron en el HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de [GABA]. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes.

Las tendencias de liberación de GABA que mostraron ambas dosificaciones de *escamonina 1* no tuvieron diferencias significativas entre sí, por lo que posiblemente su efecto no sea dependiente de la dosificación

Por otro lado, *tiriantina C* (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) mostró efecto sobre la liberación de GABA (Fig. 19), evocando un incremento significativo en la concentración de GABA extracelular en comparación con el comportamiento de “CN”.

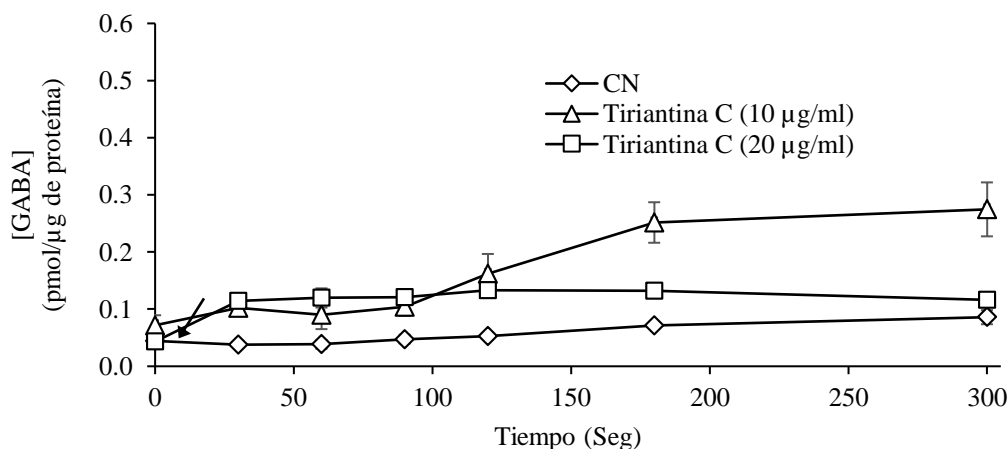


Figura 19. Liberación de GABA en medio basal en presencia de tiriantina C. La gráfica muestra el efecto que tienen dos concentraciones de *tiriantina C* (10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre la concentración de GABA ($\text{pmol}/\mu\text{g}$ de proteína) durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó *tiriantina C*. Se colectaron alícuotas de 200 μl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 μl que se inyectaron en el HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de [GABA]. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes.

La máxima concentración de GABA endógeno liberado se observó a los 300 segundos (0.274 pmol/ml μg de proteína) para la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ y a los 120 segundos (0.133 pmol/ml μg de proteína) para la dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ con respecto a la concentración inicial (0.090 y 0.071 pmol/ml μg de proteína, respectivamente) de ambos.

Las tendencias de liberación evocadas por cada dosis de tiriantina C mostraron ser significativamente diferentes entre sí, siendo la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ la de mayor efecto sobre la concentración de GABA. Por lo que el efecto de tiriantina C posiblemente dependa de la dosis para su efecto terapéutico. Se puede observar que la presencia de ambos compuestos genera un incremento en la concentración de GABA en el medio de incubación; notándose que al término del ensayo (300 segundos) los resultados nos pudieran sugerir que tan efectivos son *escamonina 1* y *tiriantina C* para producir un incremento en la liberación de GABA endógeno, todo con respecto a las dosificaciones usadas de cada compuesto y comparándolas con los controles (Fig. 20).

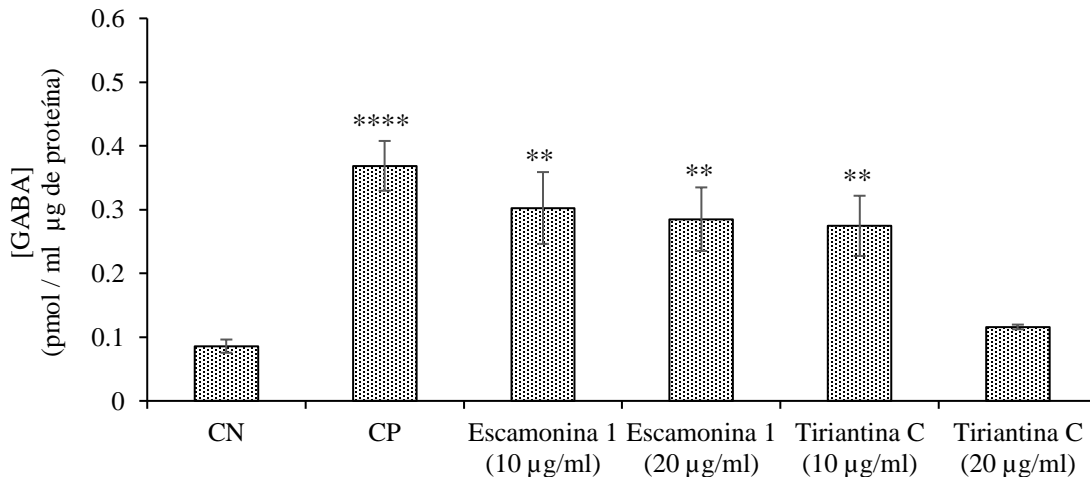


Figura 20. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación. La gráfica muestra la concentración de GABA endógeno liberado en los ensayos *in vitro* al finalizar los ensayos en presencia de *escammonina 1* y *tiriantina C* a diferentes concentraciones, en comparación con el control negativo (CN) y el control positivo (CP). Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

Sin embargo, con estos datos no se puede discernir sobre que procesos de la neurotransmisión se ven afectados por cada compuesto, especialmente los relacionados con el funcionamiento del sistema GABAérgico y que propicien el incremento en la concentración de GABA endógeno liberado.

De acuerdo con la literatura, podríamos sugerir cuatro posibles mecanismos por los cuales *escammonina 1* y *tiriantina C* pudieran tener este efecto, como lo serían la despolarización asociada al flujo de iones extracelulares (Na^+ / Ca^{2+}) al medio intracelular, el bloqueo del receptor GABA_B , la inhibición de la recaptura de GABA, y/o la activación del transporte reverso de GABA. Todos estos posibles escenarios generan la liberación del neurotransmisor y su acumulación en el medio extracelular.

Por lo anterior, se propone evaluar si el efecto de cada compuesto es dependiente de las concentraciones extracelulares de sodio y calcio o si pudieran estar relacionados con el funcionamiento del receptor GABA_B o del transportador de GABA (GAT).

3.4.2 Efecto de la concentración de sodio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escamonina 1 y tiriantina C.

La complejidad del SNC de vertebrados se atribuye, en parte, a la enorme diversidad de canales iónicos expresados en las células nerviosas y a su importancia durante la propagación de un estímulo nervioso modificando el equilibrio electroquímico a través de su apertura y cierre (Martínez-Martos *et al.*, 1998; Mouhat *et al.*, 2004; Denac *et al.*, 2000). Esto puede generar un cambio de polaridad en la membrana plasmática y por tanto lleven a un aumento en la liberación de mensajeros químicos (neurotransmisores) que modifiquen la transmisión nerviosa, tal como lo hacen los canales de sodio y de calcio.

Los *canales de sodio* son componentes importantes en la neurotransmisión, debido a que afectan procesos importantes como la generación, duración y frecuencia de los potenciales de acción en la neurona durante la respuesta nerviosa (Catterall, 2000; Nicholson, 2007; Meisler y Kearney, 2005; Cestèle *et al.*, 2006). Además, el sodio tiene un efecto regulador sobre el calcio, por lo cual la modulación del canal de sodio puede ejercer un efecto neuroprotector (Arzimanoglou *et al.*, 2002).

Debido a la importancia que tiene el estudio del papel de sodio en el efecto de moléculas con fines terapéuticos, se evaluó el efecto que tienen *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la liberación de GABA bajo condiciones de ausencia de sodio extracelular. Para ello, se utilizó cloruro de colina (118 mM) como sustituto del cloruro de sodio para determinar si la liberación basal de GABA y el efecto de ambos compuestos eran dependientes o no de las concentraciones de sodio extracelular, sin alterar el equilibrio osmótico. En algunos trabajos se menciona el uso de Li^+ como sustituto del sodio (Takahashi *et al.*, 1995), pero sin embargo al usar cloruro de colina podemos garantizar que el efecto que se observe en los ensayos *in vitro* será asociado a su dependencia o independencia de la concentración de sodio extracelular.

Controles

El patrón de liberación de GABA de los controles positivo y negativo bajo condiciones libres de sodio, demuestra el efecto que puede tener la concentración de sodio en el proceso de despolarización

neuronal, donde la concentración de GABA endógeno liberado se ve alterada. La figura 21 muestra este comportamiento, en donde se observa la liberación máxima de GABA a los 300 segundos tanto para los controles en ausencia de sodio (CN = 0.166 y CP = 0.155 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína), como para los controles presencia de sodio al mismo tiempo (CN = 0.085 y CP = 0.368 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína).

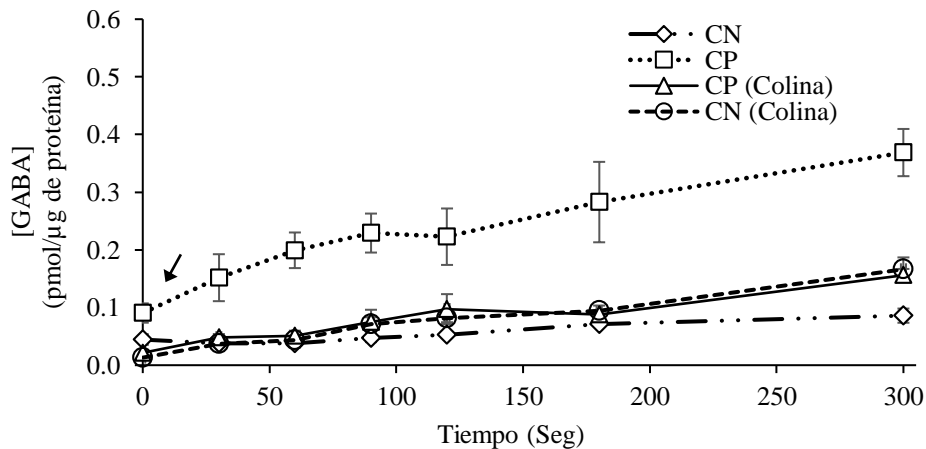


Figura 21. Efecto de la concentración de sodio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en condiciones control. La gráfica muestra el efecto que tienen la presencia y ausencia de sodio extracelular sobre la liberación de GABA ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ de proteína) basal (CN y CN_(Colina); KCl 47.0 mM) y la evocada por la alta concentración de potasio (CP y CP_(Colina); KCl 47.0 mM), durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó el medio con alto potasio en CP y CP_(Colina). Se colectaron alícuotas de 200 μl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 μl que se inyectaron al HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

La concentración basal de GABA (CN) en ausencia de sodio resulta ser ligeramente mayor a las observadas en presencia de sodio, pero no estadísticamente significativa. Esto posiblemente a que la liberación basal de GABA asociada a la vía vesicular no depende de la concentración de sodio extracelular.

Por otro lado, la concentración de GABA del CP y CN en ausencia de sodio resultó similar entre sí y significativamente menor con respecto a lo observado en CP en presencia de sodio. Este comportamiento probablemente se deba a que la alta concentración de potasio extracelular (47.0 mM KCl) en pudiera estabilizar la polaridad de membrana sin lograr su despolarización y la liberación de GABA observada en CP en presencia de sodio.

Escammonina 1 y tiriantina C

En este caso, los ensayos de liberación se realizaron a una dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ de *escammonina 1* y *tiriantina C* (Fig. 22).

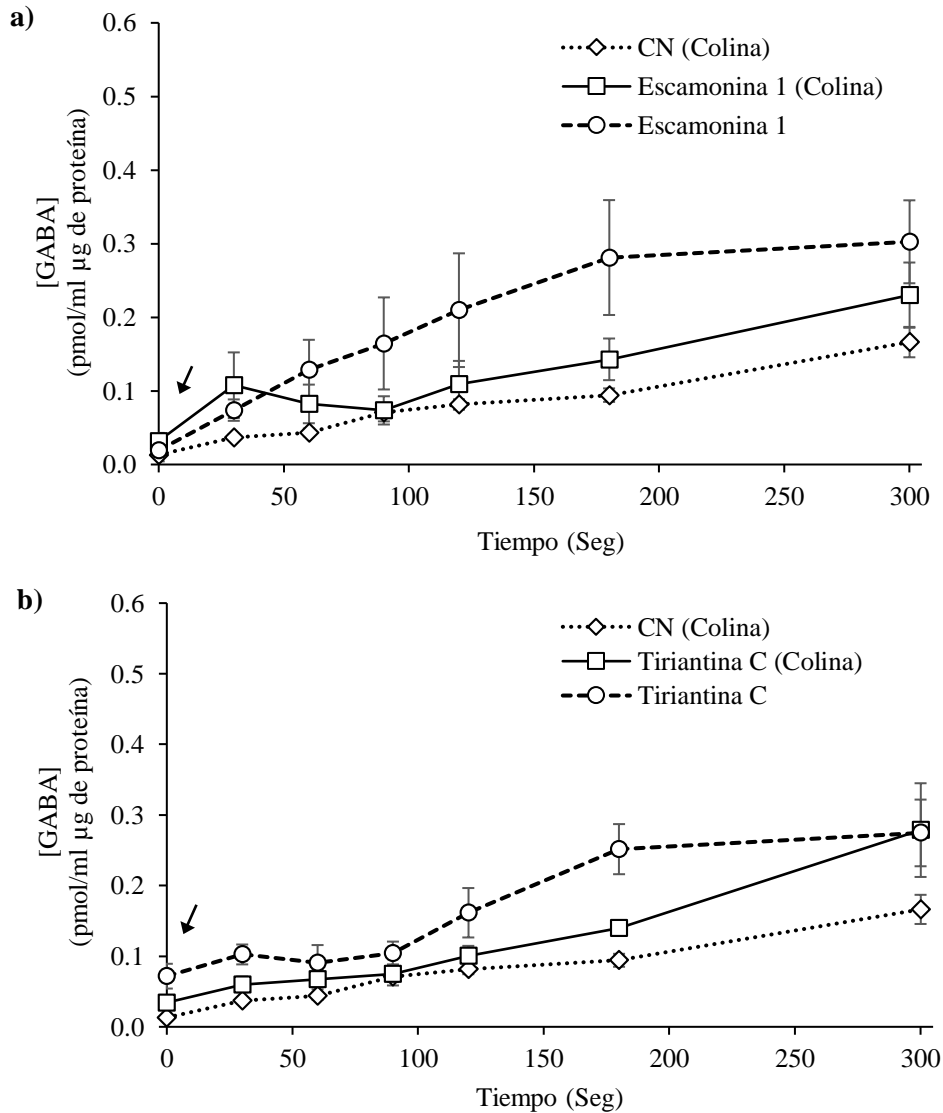


Figura 22. Efecto de la concentración de sodio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escammonina 1 y tiriantina C. La gráfica muestra el efecto que tienen la presencia y ausencia de sodio extracelular sobre la liberación de GABA ($\text{pmol}/\mu\text{g}$ de proteína) evocada por presencia de (a) *escammonina 1* y (b) *tiriantina C* ($10 \mu\text{g/ml}$), durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual fueron aplicados los compuestos. Se colectaron alícuotas de $200 \mu\text{l}$ a diferentes tiempos, tomando de cada una $20 \mu\text{l}$ que se inyectaron al HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

El efecto que tiene la *escamonina 1* (Fig. 22a) muestra diferencia significativa en la tendencia de liberación de GABA con respecto a CN en condiciones libre de sodio, y una disminución no significativa con respecto al efecto de esta glicolípido en presencia de sodio. La concentración máxima de GABA evocada por *escamonina 1* en ausencia de sodio fue de 0.230 pmol/ ml μ g de proteína a los 300 segundos, ligeramente menor con respecto a su efecto en presencia de sodio en ese mismo tiempo (0.302 pmol/ml μ g de proteína).

Por otro lado, el efecto de *tiriantina C* sobre la liberación de GABA fue similar al del CN en condiciones libres de sodio, pero menor a lo observado en las condiciones en presencia de sodio (Fig. 22b). La concentración máxima de GABA evocada por este glicolípido a los 300 segundos en condiciones ausencia de sodio (0.278 pmol/ ml μ g de proteína) fue similar a lo observado en las en presencia de sodio (0.274 pmol/ ml μ g de proteína).

La comparación de los resultados obtenidos de los ensayos en condiciones presencia y ausencia de sodio extracelular al final de los ensayos pudiera sugerir que el efecto que tienen *escamonina 1* (Fig. 23a) y *tiriantina C* (Fig. 23b) posiblemente sea por mecanismos similares dependientes de la concentración de sodio extracelular, tales como la actividad del canal de sodio o del transportador de GABA.

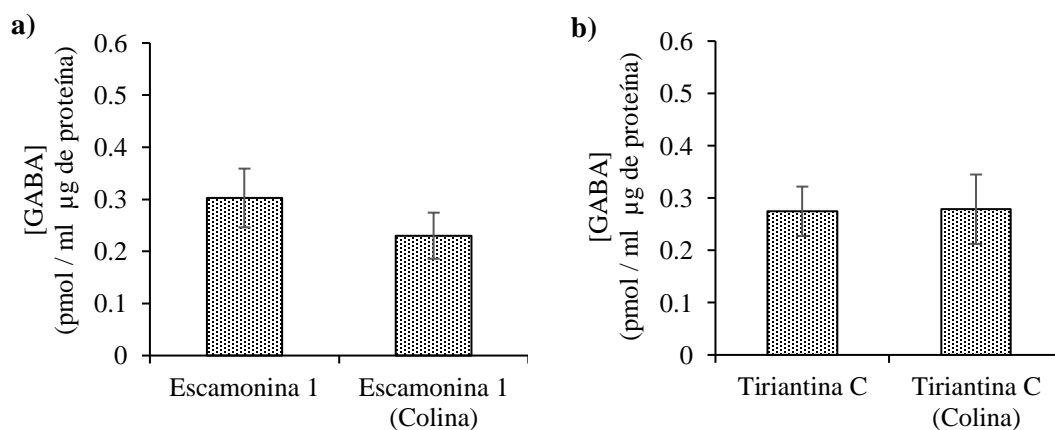


Figura 23. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación en presencia y ausencia de sodio extracelular. La gráfica muestra la concentración de GABA endógeno liberado en los ensayos *in vitro* al finalizar los ensayos en presencia o ausencia de sodio con (a) *escamonina 1* y (b) *tiriantina C* (10 μ g/ml), en comparación con “CN”. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

3.4.3 Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escamonina 1 y tiriantina C.

Se conoce que el calcio juega un papel fundamental en las reacciones de excitotoxicidad y en la facilitación de la neurotransmisión GABAérgica, protegiendo a la neurona de los efectos de la descarga de aminoácidos excitatorios. Esto es debido a que el incremento en la concentración de Ca^{2+} promueve la liberación de neurotransmisores en la terminal presináptica, por medio de mecanismos relacionados con proteínas que están implicadas en el transporte, acoplamiento y fusión de las vesículas que contienen neurotransmisores. Además, este ion interviene en una gran variedad de funciones celulares en el sistema nervioso, tales como la modulación de la excitabilidad de la membrana y secreción de neurotransmisores, contracción muscular y expresión genética; de modo que, los canales de Ca^{2+} constituyen el enlace principal entre las señales eléctricas en la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares (Sandor *et al.*, 1989; Bidaud *et al.*, 2006; Martínez-Martos *et al.*, 1998; Medel Matus *et al.*, 2010; Rogawski y Löscher, 2004).

Algunos fármacos que bloquean canales de calcio han resultado útiles en el tratamiento de la epilepsia (McNamara, 2004), ya que evitan el incremento en la concentración calcio intracelular en la neurona postsináptica. El aumento de los niveles de calcio ha sido asociado con varios procesos causantes de epileptogénesis, tales como una despolarización sostenida, activación inducida y excitotoxicidad (Medel *et al.*, 2010; Rogawski y Löscher, 2004).

Comúnmente se ha encontrado que aquellos compuestos que tienen efecto sobre la funcionalidad del sistema nervioso alteran la actividad de este tipo de canales iónicos, por medio de la interacción de los compuestos con algún sitio receptor en el canal, que modifique su activación y/o inactivación, o simplemente los bloquee (Catterall, 2000).

Con respecto a los glicolípidos, no se conoce exactamente el modo en el que pudieran interferir sobre la actividad de los canales de calcio, pero se sabe que tienen actividades biológicas que están relacionadas con el flujo de calcio en la célula. Para definir si la variación en la concentración de GABA por efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* es dependiente de la concentración de calcio extracelular, se utilizó EGTA como agente quelante a una concentración de 100 μM .

Controles

La concentración de GABA presenta un comportamiento estable para CN, tanto en presencia como en ausencia de calcio, manteniendo una concentración de entre 0.010 – 0.031 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína a lo largo del ensayo (Fig. 24); con lo que podemos decir que la disponibilidad de calcio extracelular no afecta la liberación basal de GABA. Esto apoya lo reportado en la literatura donde aparentemente la presencia y/o ausencia de Ca^{2+} no modifica la concentración basal de GABA, debido a que ésta se da por mecanismos diferentes a los de liberación vesicular (dependiente de la disponibilidad de calcio), tal como la vía de transporte reverso (Sandor *et al.*, 1989; Richerson y Wu, 2003).

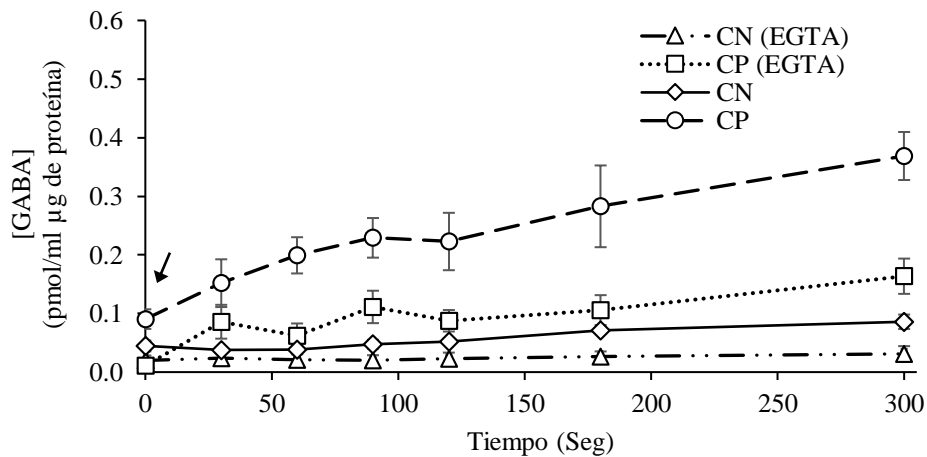


Figura 24. Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en condiciones control. La gráfica muestra el efecto que tienen la presencia y ausencia de calcio extracelular sobre la liberación de GABA ($\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína) basal (CN; KCl 4.7 mM) y la evocada en condiciones despolarizantes (CP; KCl 47.0 mM), durante 5 minutos de incubación. Usando como agente quelante al EGTA (100 μM). La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó el medio con alto potasio. Se colectaron alícuotas de 200 μl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 μl que se inyectaron al HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

Por el contrario, en el caso del CP tendencia de liberación de GABA fue significativamente menor en ausencia que en presencia de calcio, cuya concentración máxima de GABA observada a los 300 segundos fue de 0.163 y 0.368 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína, respectivamente (Fig. 24). Esto nos sugiere que la liberación de neurotransmisores evocada por la presencia de un estímulo despolarizante pudiera estar dada en parte por mecanismos de liberación vesicular, los cuales son activados por el incremento en la concentración de calcio intracelular producida por la apertura de los canales de calcio presentes en la membrana.

Escamonina 1 y tiriantina C

Para el caso del efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la liberación de GABA endógeno, la falta de calcio extracelular disminuyó significativamente su actividad con respecto a las condiciones en presencia de calcio extracelular (Fig. 25). La concentración de GABA se mantuvo estable a lo largo del ensayo (0.033 – 0.031 pmol/ml µg de proteína para *escamonina 1* y de 0.035 – 0.030 pmol/ml µg de proteína para *tiriantina C*), mostrando una concentración máxima de GABA de 0.045 pmol/ml µg de proteína a los 30 segundos para ambos casos.

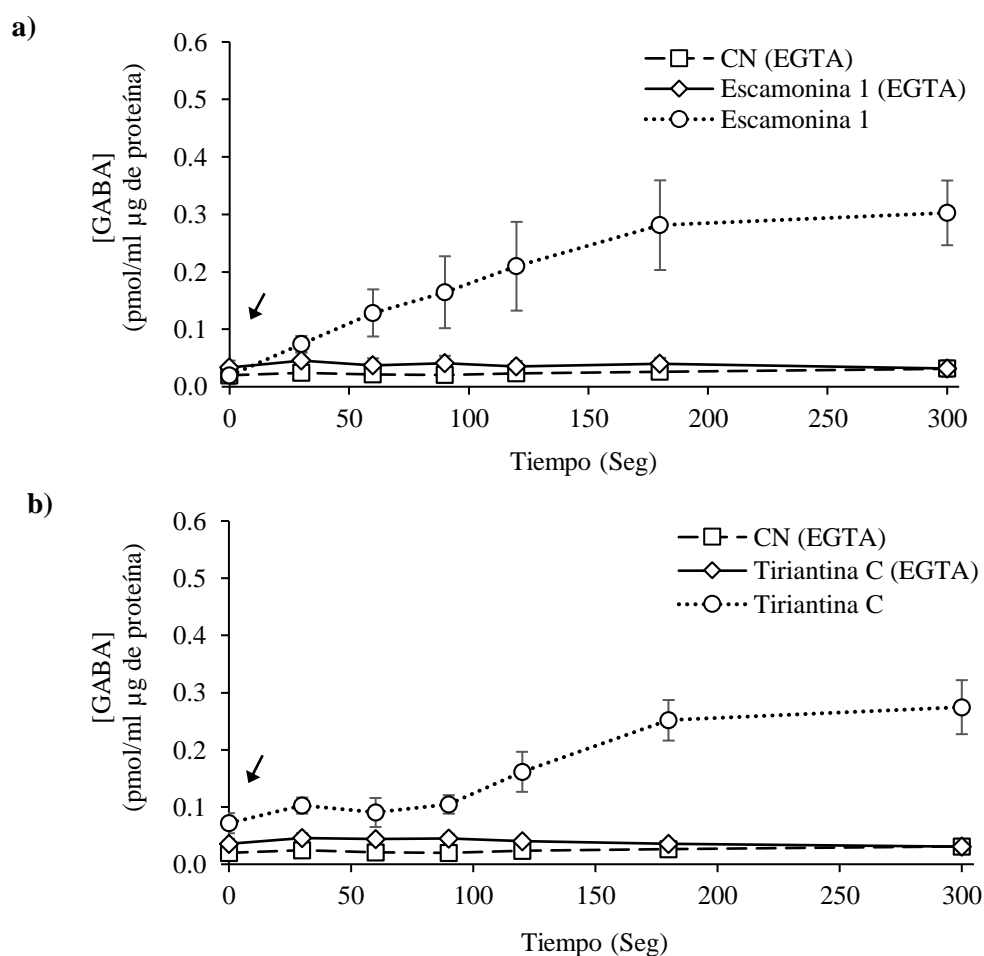


Figura 25. Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre la liberación de GABA endógeno en presencia de escamonina 1 y tiriantina C. La gráfica muestra el efecto que tienen la presencia y ausencia de calcio extracelular sobre la liberación de GABA (pmol/µg de proteína) evocada por presencia de (a) *escamonina 1* y (b) *tiriantina C* (10 µg/ml), durante 5 minutos de incubación; donde se colectaron alícuotas de 200 µl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 µl que se inyectaron en el HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. La flecha señala el tiempo en el cual fueron aplicados los compuestos. Los valores son los promedios ± SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

Si se comparan las concentraciones máximas vistas en los ensayos en presencia y ausencia de calcio (Fig. 26), podemos sugerir que los mecanismos de acción de *escamonina 1* y *tiriantina C* son dependientes directa o indirectamente de la concentración de calcio extracelular, ya sea por estar relacionados con la actividad del canal de calcio o del receptor GABA_B.

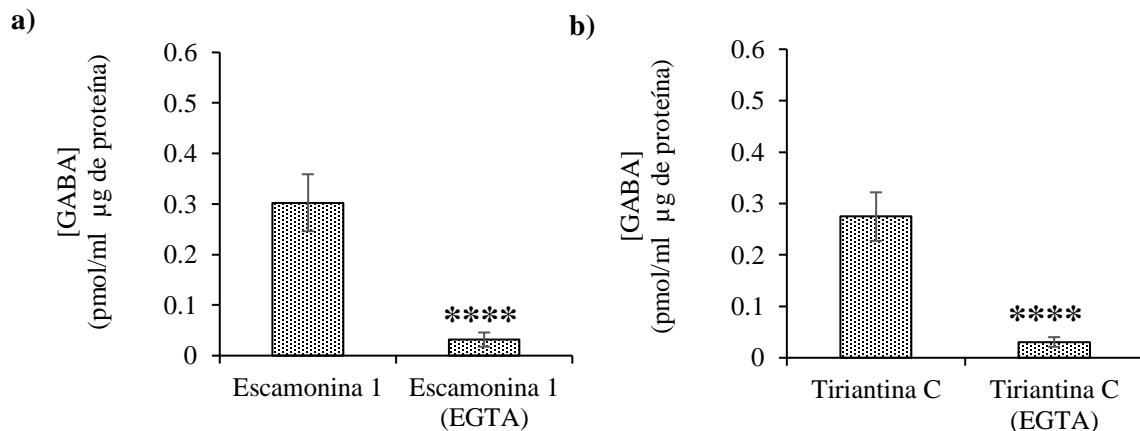


Figura 26. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación en presencia y ausencia de sodio extracelular. Las gráficas muestran las concentraciones de GABA endógeno liberado en los ensayos *in vitro* en presencia o ausencia de calcio con (a) *escamonina 1* y (b) *tiriantina C* (10 µg/ml) a los 300 segundos. Los valores son los promedios ± SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, **** = $p < 0.0001$.

Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que *escamonina 1* y *tiriantina C*, al igual que otros compuestos, tales como los gangliósidos, entren a la célula iniciando cascadas de señalización vía segundos mensajeros, activando el flujo del calcio contenido en los depósitos intracelulares (p. ej., retículo endoplásmico y mitocondrias) (Sandor *et al.*, 1989) y, por tanto, estimulando la fusión vesicular y la liberación del neurotransmisor debido al incremento en la concentración de calcio intracelular.

3.4.4 Efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la actividad del transportador de GABA (GAT).

En el sistema nervioso existen procesos que ayudan a regular la concentración de los neurotransmisores liberados al medio extracelular con el fin de mantener un equilibrio fisiológico. Con respecto a la función GABAérgica, esta se encuentra regulada principalmente por la actividad de un grupo de proteínas transportadoras específicas de GABA (GAT) que se encuentran unidas a la

membrana de la neurona presináptica o de células gliales adyacentes (principalmente los astrocitos). Su función es la de eliminar o regular la concentración de GABA de la hendidura sináptica a través de su recaptura o liberación, transportándolo del medio extracelular al intracelular o viceversa (Barakat y Bordey, 2002; Dunlop, 2002; Haines, 2003; Eulenburg y Gomeza, 2010).

La actividad de los transportadores GAT es impulsada principalmente por la energía del gradiente electroquímico de sodio, translocando una molécula de GABA al mismo tiempo que se transportan dos iones Na^+ y un ion Cl^- . La capacidad que tienen de trabajar en sentido inverso se da en función de la concentración de Na^+ interno y la despolarización de la membrana, lo cual los hace importantes en el control de la excitabilidad al regular el nivel de inhibición, manteniendo un nivel basal relativamente alto de GABA en SNC (neurotransmisión GABAérgica no-vesicular) para activar receptores de alta afinidad GABA_A (Takahashi *et al.*, 1995; Risso *et al.*, 1996; Barakat y Bordey, 2002; John Dunlop, 2002; Richerson y Wu, 2003; Wu *et al.*, 2007; Meinild *et al.*, 2009).

Actualmente, la disminución en la neurotransmisión GABAérgica ha sido implicada en la fisiopatología de varios trastornos del sistema nervioso central, por lo que el uso de fármacos que inhiban selectivamente la recaptura de GABA en células gliales y/o neuronas (p. ej., tiagabina, β -alanina y guvacina) o que permitan el control de la excitabilidad mediante mecanismos de liberación GABAérgica no-vesiculares (p. ej., ácido nipecótico, gabapentina y vigabatrina), puede ser una nueva alternativa para la modulación fisiológica y farmacológica (Gadea y López, 2001; Eulenburg y Gomeza, 2010; Sarup *et al.*, 2003; White *et al.*, 2002; Siegel *et al.*, 1999; John Dunlop, 2002; Richerson y Wu, 2003; Wu *et al.*, 2007). Se cree que probablemente algunos metabolitos naturales con actividad neuroprotectora y/o anticonvulsiva pudieran tener mecanismos de acción relacionados con la actividad de los transportadores GAT ante descrita. Por lo que se evaluaron a *escamoina I* y *tiriantina C* en comparación con el efecto que ejerce la guvacina (100 μM) sobre el mecanismo de recaptura.

Controles

Los resultados obtenidos para CN en presencia de guvacina muestran una tendencia mayor de liberación de GABA, aumentando significativamente su concentración de forma gradual a lo largo

del ensayo con respecto a las condiciones libres de guvacina (Fig. 27). La concentración máxima de liberación GABA evocada a los 300 segundos en CN es mayor en presencia que en ausencia de guvacina (0.317 y 0.085 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína, respectivamente).

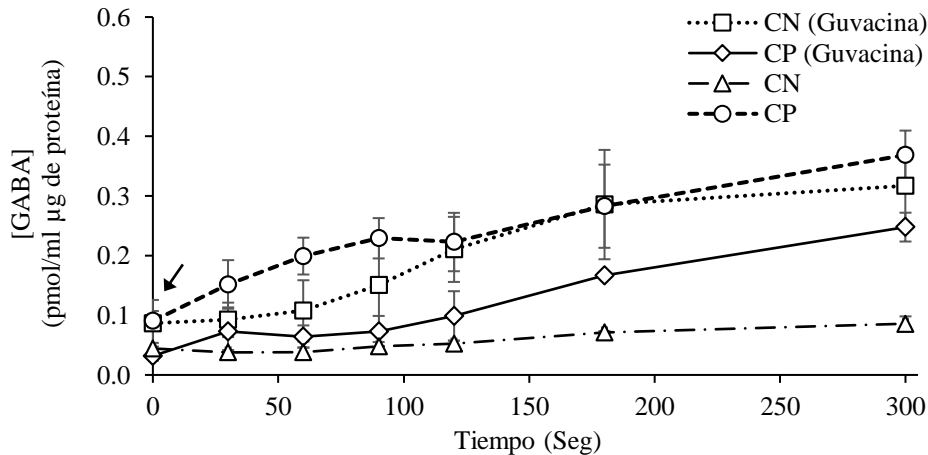


Figura 27. Efecto de guvacina sobre la concentración de GABA endógeno liberado en condiciones control. La gráfica muestra el efecto que Guvacina ($100\mu\text{M}$) sobre la concentración de GABA (pmol/ml μg de proteína) basal (CN; KCl 4.7 mM) y la evocada en condiciones despolarizantes (CP; KCl 47.0 mM), durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó el medio con Guvacina y alto potasio. Se colectaron alícuotas de $200\ \mu\text{l}$ a diferentes tiempos, tomando de cada una $20\ \mu\text{l}$ que se inyectaron al HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

Se observó que la liberación de GABA en presencia de guvacina en la condición CP aumento a lo largo del tiempo, pero en concentraciones significativamente menores a las mostradas por en ausencia de este inhibidor, cuyas concentraciones máximas de GABA (a los 300 segundos) fueron de 0.247 y 0.368 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína, respectivamente.

El aumento de la concentración de GABA endógeno liberado en CN en presencia de guvacina corrobora el efecto de este inhibidor, que al evitar la recaptura de GABA, evoca un incremento de su concentración en el medio extracelular. Sin embargo, en el caso de CP no está muy claro el efecto producido por guvacina bajo condiciones despolarizantes, en las que el equilibrio electroquímico se encuentra alterado por la alta concentración de potasio extracelular.

Escamonina 1 y tiriantina C

Para el caso de escamonina 1 y tiriantina C en presencia de guvacina, en general ambas mantuvieron una tendencia con comportamiento similar al que mostró CN, en donde la concentración de GABA endógeno liberado no tuvo diferencias significativas entre sí (Fig. 28).

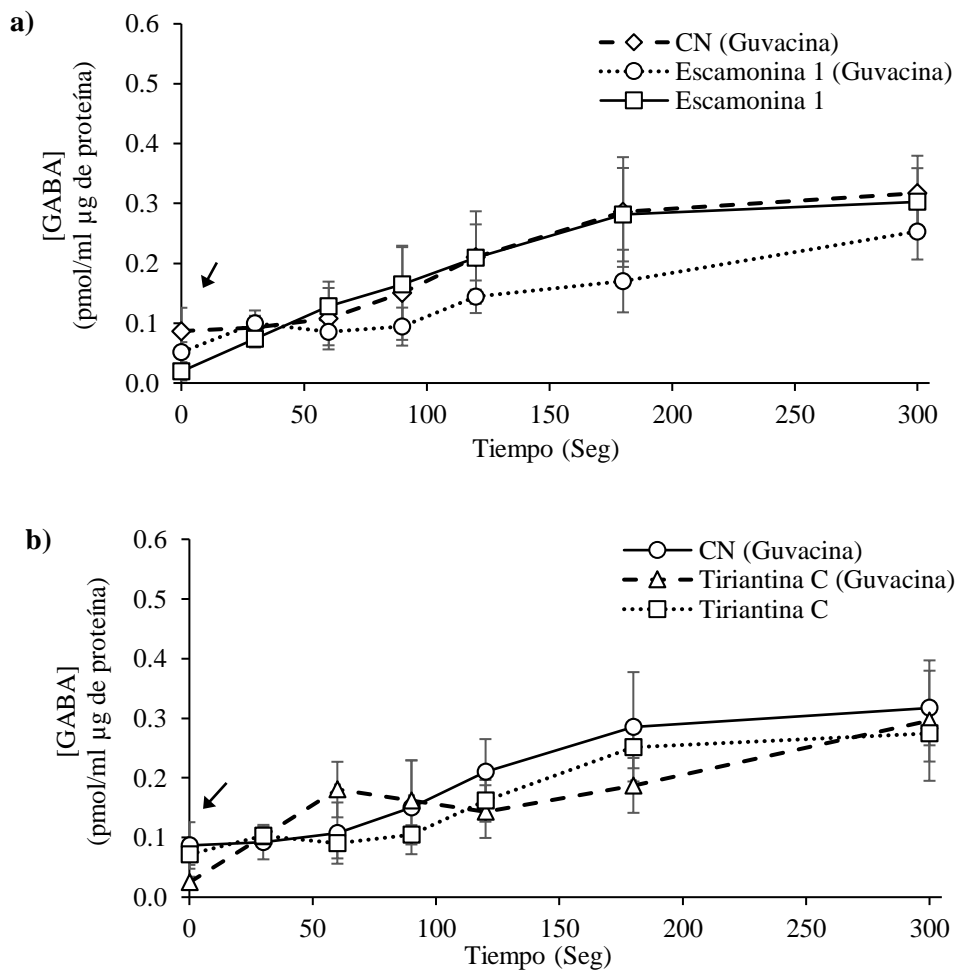


Figura 28. Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la liberación de GABA endógeno en presencia y ausencia de guvacina. La gráfica muestra la tendencia del efecto que tienen (a) *escamonina 1* y (b) *tiriantina C* (10 µg/ml) sobre la liberación de GABA (pmol/µg de proteína) evocada, en presencia y ausencia de guvacina (100µM) durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual fueron aplicados los compuestos. Se colectaron alícuotas de 200 µl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 µl que se inyectaron en el HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios ± SEM de 5 experimentos independientes (ausencia y presencia de guvacina). ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

Escamonina 1 en presencia de guvacina evocó una liberación de GABA ligeramente menor pero no significativa en comparación con su efecto en ausencia del inhibidor (Fig. 28a), mostrando las concentraciones máximas del neurotransmisor a los 300 segundos de 0.253 y 0.302 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína, respectivamente. Para el caso de tiriantina C no se observó diferencia significativa en la tendencia de liberación de GABA (Fig. 28b), tanto en presencia o ausencia de guvacina, obteniéndose concentraciones máximas de GABA endógeno liberado de 0.302 y 0.302 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína a los 300 segundos. El efecto observado para escamonina 1 y tiriantina C sobre la concentración de GABA endógeno liberado al final de los ensayos en presencia de guvacina, pudiera sugerir que su mecanismo de acción posiblemente no está relacionado con el mecanismo de recaptura estrictamente hablando, sino que pudiera estar posiblemente involucrado con los mecanismos de transporte reverso o con la función de otro elemento en la sinapsis GABAérgica.

3.4.5 Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la actividad del receptor GABA_B.

En SNC, la excitación neuronal se ve regulada por la transmisión inhibitoria lenta y prolongada evocada por GABA, que a su vez es mediada a través de la actividad de receptores específicos denominados GABA_B (Wood *et al.*, 2000; Luján, 2004; Benke *et al.*, 2002; Martin y Dunn, 2002; Enna, 2001; Bettler *et al.*, 2004). Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, tanto en la membrana de la neurona presináptica, así como en la postsináptica. Es activado por GABA, tras una actividad neuronal intensa, de dendritas y células gliales. Recientemente, se ha demostrado que la actividad sináptica basal genera una concentración suficiente de GABA ambiente para inducir tónicamente un nivel bajo de activación presináptica del receptor de GABA_B, lo que resulta en el control de la liberación del transmisor (Benke *et al.*, 2002).

GABA_B es un receptor cuya activación retarda la fusión vesicular y reduce la liberación del transmisor, modificando la función del adenilato ciclasa, disminuyendo el flujo de Ca^{2+} a nivel presináptico y generando el aumento en el flujo de K^{+} a nivel postsináptico (Schwarz *et al.*, 2000; Enna, 2001; Benke *et al.*, 2002; Luján, 2004). Cabe destacar que no existe una estricta separación mecánica entre los sistemas efectores presinápticos (canales de Ca^{2+}) y postsinápticos (canales de K^{+}) (Benke *et al.*, 2002).

Se ha visto que el receptor GABA_B es selectivamente activado por fármacos como el baclofen y selectivamente antagonizado por fármacos como el faclofen y el saclofen (Enna, 2001; Wood *et al.*, 2000). Además, se le ha involucrado con desordenes como la epilepsia, neuropatías que alteran la nocicepción, enfermedades gastrointestinales y adicciones (Bowery *et al.*, 2002; Bettler *et al.*, 2004). Por lo que se ha propuesto que algunos compuestos naturales con actividad sobre SNC pudieran tener como sitio blanco este tipo de receptores, tales como los glicolípidos de *Ipomoea tyrianthina*.

Controles

El efecto del 2-hidroxisaclofen sobre la liberación de GABA de CN fue muy parecido al observado en CP normal; sin embargo, la concentración de GABA evocada en CP fue significativamente menor en comparación a CN en presencia de este antagonista (Fig. 29). La presencia de 2-hidroxisaclofen evocó liberación de GABA significativamente mayor (0.386 pmol/ml µg de proteína) a la concentración basal normal (0.085 pmol/ml µg de proteína) a los 300 segundos. Este comportamiento es generado por el efecto antagonista que tiene el 2-hidroxisaclofen sobre el receptor GABA_B que regula la liberación presináptica de GABA y, por tanto, evoca un aumento en la concentración de GABA extracelular.

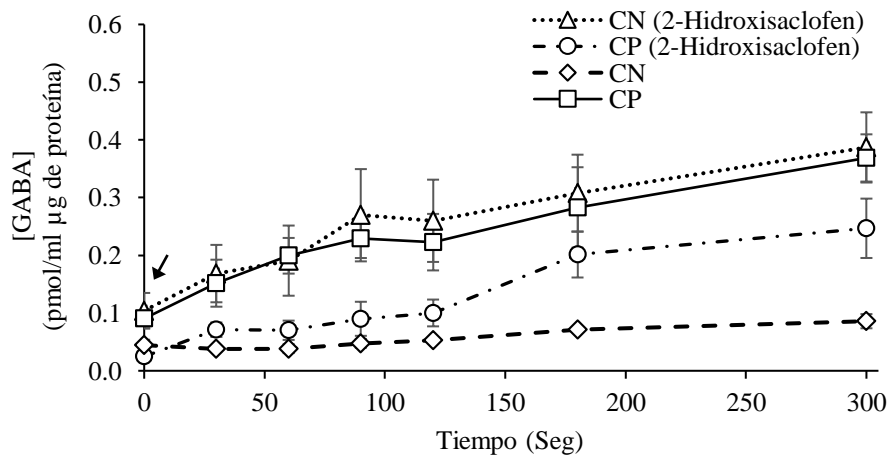


Figura 29. Efecto de 2-hidroxisaclofen sobre la concentración de GABA endógeno liberado en condiciones control. La gráfica muestra el efecto que 2-hidroxisaclofen (100µM) sobre la concentración de GABA (pmol/ml µg de proteína) basal (CN; KCl 4.7 mM) y la evocada en condiciones despolarizantes (CP; KCl 47.0 mM), durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual se aplicó el medio con Guvacina y alto potasio. Se colectaron alícuotas de 200 µl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 µl que se inyectaron al HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios ± SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, p<0.05.

Escamonina 1 y tiriantina C

La presencia de 2-hidrisaclofén no alteró significativamente el efecto basal de escamonina 1 y tiriantina C (Fig. 30), manteniendo el incremento de la concentración de GABA endógeno liberado; sin embargo, este efecto fue significativamente menor a las que mostró el CN.

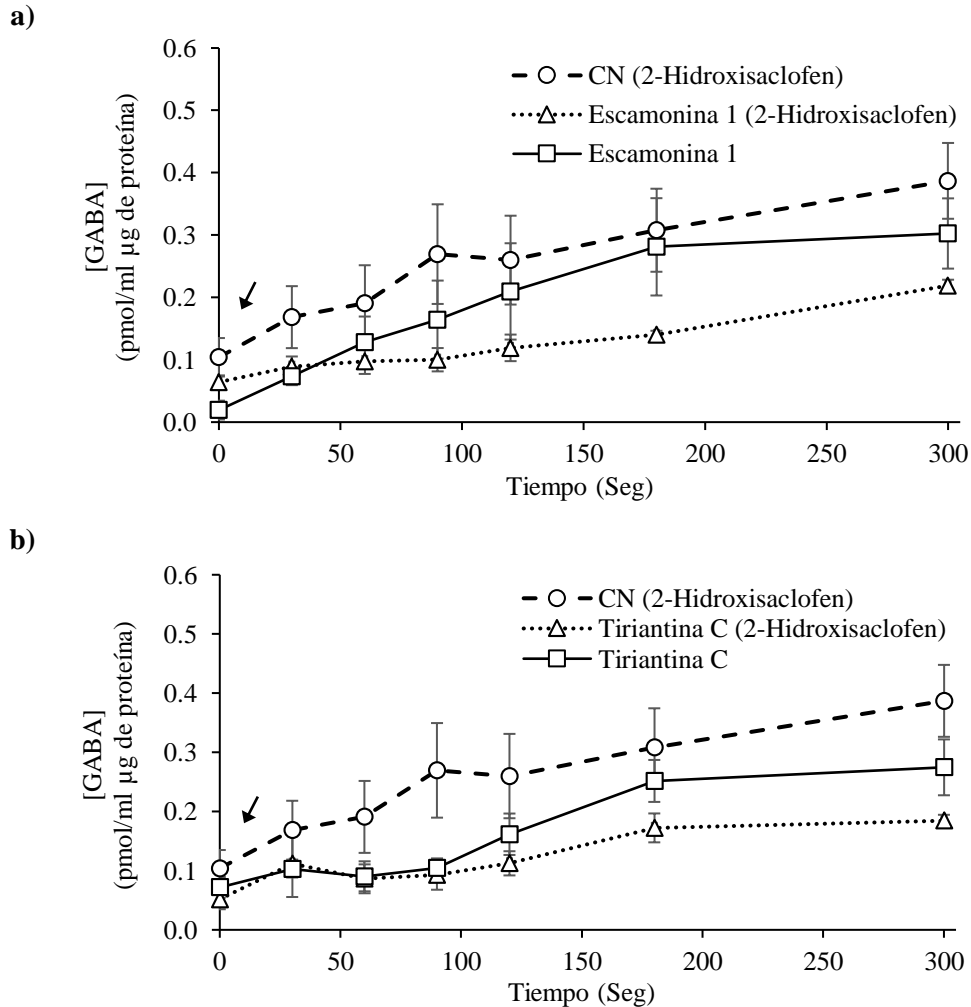


Figura 30. Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre la liberación de GABA endógeno en presencia y ausencia de 2-hidroxisaclofén. La gráfica muestra la tendencia del efecto que tienen (a) *escamonina 1* y (b) *tiriantina C* (10 µg/ml) sobre la liberación de GABA (pmol/µg de proteína) evocada, en presencia y ausencia de 2-hidroxisaclofén (100µM) durante 5 minutos de incubación. La flecha señala el tiempo en el cual fueron aplicados los compuestos. Se colectaron alícuotas de 200 µl a diferentes tiempos, tomando de cada una 20 µl que se inyectaron en el HPLC, previa derivatización con OPA, para la cuantificación de GABA. Los valores son los promedios ± SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, $p < 0.05$.

Las concentraciones máximas de GABA evocadas por escamonina 1 (0.218 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína) y tiriantina C (0.184 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína) a los 300 segundos fueron ligeramente menores a las obtenidas en condiciones en ausencia de 2-hidrisaclofén (0.302 y 0.274 $\mu\text{mol/ml}$ μg de proteína, respectivamente), pero solamente significativamente más baja para tiriantina C.

El efecto observado para escamonina 1 y tiriantina C en comparación con de las liberaciones máximas de GABA obtenida en ausencia de 2-hidrisaclofén (Fig. 31), posiblemente sugiere que su mecanismo de acción no está relacionado con el funcionamiento del receptor GABA_B, y que pudiera estar involucrado con otros mecanismos dentro de la sinapsis GABAérgica.

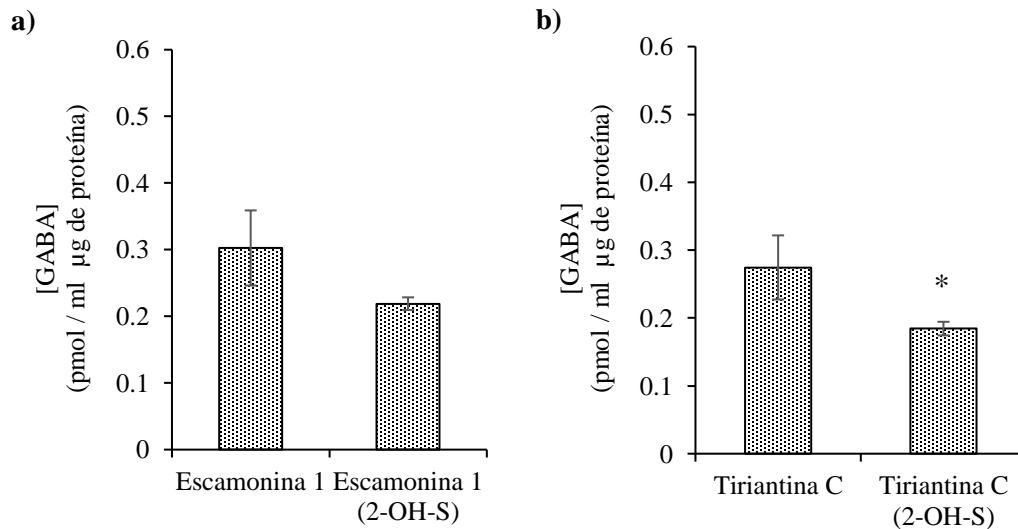


Figura 31. Comparación de la concentración de GABA al término de los ensayos de liberación en presencia y ausencia de 2-hidroxisaclofén. Las gráficas muestran las concentraciones de GABA endógeno liberado en los ensayos *in vitro* en presencia o ausencia de 2-hidroxisaclofén con (a) *escamonina 1* y (b) *tiriantina C* (10 $\mu\text{g/ml}$) a los 300 segundos. Los valores son los promedios \pm SEM de 5 experimentos independientes. ANOVA / Bonferroni, * = $p < 0.05$.

Sin embargo, existe la posibilidad de que este tipo de compuestos pudieran tener un efecto modulador sobre el receptor GABA_B, lo que justificaría la disminución en la concentración de GABA con respecto al efecto evocado solo por el 2-hidroxisaclofen en CN.

3.5 Discusión

Como ya se mencionó, la neurotoxicidad es una de las principales vías por las cuales algunas lesiones cerebrales o procesos neurodegenerativos ejercen un efecto negativo en el SNC. Por lo que la búsqueda de agentes que eviten estos procesos ha sido de importancia desde hace algunos años.

Existe una amplia gama de plantas a las cuales se les atribuye efectos neuroprotectores, principalmente aquellas en las que dicha actividad se ve acompañada de un efecto anticonvulsivo. De acuerdo con Quintans *et al.* (2008), algunas cumarinas y triterpenoides naturales provenientes de plantas exhiben propiedades anticonvulsivantes y posiblemente neuroprotectoras. Sin embargo, este grupo de compuestos no son los únicos con este tipo de actividades (Quintans *et al.*, 2008). Esto se debe a que algunos fitoquímicos tienen la capacidad de modificar la excitabilidad neuronal, al intervenir en los procesos de activación o inhibición de receptores o canales iónicos específicos.

Una de las vías de acción planteadas, destaca el papel que tienen estos fitoquímicos sobre la actividad excitotóxica, es decir, el efecto que pudieran tener al bloquear receptores del ácido glutámico, antagonizar receptores NMDA o agonizar receptores de GABA; siendo la actividad GABAérgica uno de los mecanismos de neuroprotección intrínsecos a nivel fisiológico actualmente estudiados. Por lo que se ha propuesto que aquellos agentes que promueven el aumento en la concentración de GABA, evitan su degradación o activan su síntesis, son candidatos potenciales como fármacos neuroprotectores.

La eficacia de los distintos fármacos neuroprotectores actuales reside en la capacidad que tienen de modular la hiper-excitabilidad neuronal patológica que caracteriza a algunos trastornos como la epilepsia (Kumar y Khanum, 2012). Se propone la existencia de cuatro mecanismos principales por los cuales estos fármacos actúan para modificar esta hiper-excitabilidad neuronal (Macdonald R. L. et al., 1995): 1) aumento de la inhibición neuronal mediada por el sistema gabaérgico; 2) bloqueo de canales de sodio voltaje-dependientes; 3) reducción de las corrientes de calcio; y 4) disminución de la excitabilidad neuronal sináptica dependiente de glutamato.

Existen muchos compuestos a los que se les ha atribuido algún tipo de efecto sobre la transmisión GABAérgica. Recientemente se han estudiado algunos glicolípidos con actividad anticonvulsiva y/o neuroprotectora, los cuales pudieran modificar la neurotransmisión en la corteza cerebral al alterar los sistemas de inhibición (GABA) o excitación (glutamato y aspartato), ambos relacionados con la generación de convulsiones y/o daño neuronal (López, 2005).

De acuerdo con algunos estudios, algunos de estos compuestos alteran la concentración basal de GABA y ácido glutámico en la corteza cerebral (Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009; Castro, 2011), como por ejemplo aquellos aislados de *Ipomoea stans* (Herrera *et al.*, 2007) e *Ipomoea tyrianthina* (Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009), cuyo efecto se ha relacionado con la alteración de los mecanismos de liberación de dichos neurotransmisores. Sin embargo, aún no se tiene suficiente información al respecto.

Escamonina 1 y tiriantina C, son compuestos a los cuales se les han atribuido actividad neuroprotectora y/o anticonvulsiva, y que mostraron un efecto significativo al incrementar la concentración de GABA endógeno liberado (Mirón *et al.*, 2007; León *et al.*, 2014).

De acuerdo con lo observado en los resultados, escamonina 1 y tiriantina C pudieran tener un mecanismo de acción en donde se vean involucrados más de un sitio blanco de la sinapsis GABAérgica. Prueba de esto es la dependencia de su efecto por la concentración de calcio, lo cual pudiera sugerir su participación en la activación de canales de calcio o rutas de señalización en la que se evoque un incremento en la concentración de calcio intracelular y la posterior estimulación de la liberación de neurotransmisor vía vesicular. Algo similar fue observado en el efecto de ácido tiriantínico VI y tiriantina A, donde su efecto fue dependiente de la concentración de sodio y/o calcio extracelular (Castro, 2011).

Este comportamiento no es nuevo, ya que el efecto que pudieran tener algunos fármacos ejerciendo modulación sobre la activación de la actividad de los canales iónicos, tal como ocurre el encaso del canal de sodio (carbamazepina, oxcarbamazepina, fenitoina, lamotrigina y zonisamida, y en menor medida valproato de sodio y topiramato) (Catterall, 2000) y el canal de calcio (etosuximida, gabapentina, topiramato y lamotrigina) (Catterall, 2000), ya se ha descrito en la literatura.

Por otro lado, el efecto de escamonina 1 y tiriantina C también pudiesen estar ligado a la modulación de sitios de regulación GABAérgica como lo son los transportadores (GAT) o los receptores (GABAB), en los que pudiera activar la liberación de GABA vía no-vesicular (transporte reverso) o simplemente funcionar como agente modulador en los procesos de inhibición de la recaptura (transporte reverso) o modulación de la actividad inhibitoria lenta realizada por el receptor GABAB. De acuerdo con Castro (2011), ácido tiriantínico VI y tiriantina A posiblemente tienen efecto sobre el proceso de recaptura de GABA, donde se observó actividad sinérgica a la de la guvacina; y que al igual que tiagabina (Mehta, 1999), pudieran estar inhibiendo la recaptura de GABA. La actividad que tienen este tipo de compuestos en los ensayos *in vitro* sugiere que tienen diferentes sitios blanco de acción, cuyo objetivo es el de propiciar la liberación del neurotransmisor (efecto modulador) e incrementar su concentración en la hendidura sináptica al modificar la actividad del transportador (inhibiendo la recaptura o activando al transportador reverso) o al receptor GABA_B (antagonizar).

Sin embargo, cabe destacar que estas no son las únicas vías por las que se ve alterada e incrementada la concentración de GABA. Existen aquellas relacionadas con la modulación de la función enzimática de GAD y GABA-T, involucradas en la síntesis y metabolización de GABA, respectivamente. Esto es, aumentando la producción de GABA y disminuyendo la de glutamato (p. ej.; modulación de GAD por valproato de sodio y gabapentina) o alterando su eliminación (p. ej.; inhibición de GABA-T por vigabatrina) (Mehta, 1999).

Por lo que no se puede descartar la posibilidad de que los mecanismos de acción de escamonina 1 y tiriantina C involucren un efecto sobre la actividad del canal de potasio, procesos glutamatérgicos e incluso GABAérgicos postsinápticos (Kumar y Khanum, 2012; Mehta, 1999).

3.6 Conclusiones

- *Escamonina 1* y *tiriantina C* tienen efecto sobre la liberación de GABA, incrementando su concentración en los ensayos *in vitro*.
- El efecto de *tiriantina C* sobre la concentración de GABA es dosis-dependiente.

- El efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* es independiente de la concentración de sodio extracelular y dependiente de la concentración de calcio extracelular.
- *Escamonina 1* y *tiriantina C* pudieran estar modulando la actividad de receptores y /o canales iónicos.
- EL mecanismo de acción de *escamonina 1* y *tiriantina C* pudiera involucrar al menos dos vías:
 - 1) Estimulación la liberación de GABA endógeno vía-vesicular y/o glial.
 - 2) Modulación de la actividad GABAérgica.

Capítulo 4 : Actividad anticonvulsiva y neuroprotectora de escamonina 1 y tiriantina C

4.1 Neuroprotección

La neuroprotección se refiere al efecto de cualquier sustancia o molécula, sintética o biológica con efectos protectores en el sistema nervioso, que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de algunas enfermedades neurodegenerativas crónicas o de lesiones cerebrales agudas. Los compuestos neuroprotectores evitan la degeneración y muerte de las neuronas.

Con respecto a los eventos que generan daño neurológico, se ha observado que estos desencadenan una serie de efectos a nivel celular, en los que se observa de manera inicial una falla energética (daño mitocondrial) generada por la interrupción del aporte de oxígeno y glucosa. Posteriormente, se da la excitotoxicidad por el incremento de neurotransmisores excitatorios como el glutamato en el espacio extracelular, el incremento de la concentración de calcio intracelular, se produce daño oxidativo por la excesiva cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno presentes en el tejido nervioso, el aumento de la respuesta inflamatoria (como consecuencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica) y, finalmente, la activación de las señales de muerte celular programada (apoptosis).

Para revertir este proceso, se han desarrollado estrategias neuroprotectoras que intentan regular o detener los principales mecanismos de daño celular; sin embargo, aún existe la necesidad de encontrar nuevas moléculas neuroprotectoras de efectividad integral.

4.1.1 Evaluación de la actividad neuroprotectora

Existe una gran variedad de moléculas que muestran propiedades neuroprotectoras, sin embargo, su uso en el humano no ha sido estudiado de forma integral.

Se conoce que el daño en SN involucra múltiples factores que traen como consecuencia final la degeneración celular y la muerte neuronal. Por lo que al estudiar las propiedades neuroprotectoras de nuevos compuestos, éstos son evaluados con respecto a su efecto a nivel celular (sobre rutas de señalización celular ligada a apoptosis, neuromodulación, inmunomodulación, activación gliar, etc.) y a nivel terapéutico (por su actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticonvulsiva).

Numerosos estudios han propuesto que la excitotoxicidad es uno de los principales mecanismos por los cuales se desencadena la neurodegeneración en varias condiciones neuropatológicas. Y que, además, la presencia de crisis convulsivas (agudas o crónicas), además de generar cambios conductuales, puede producir alteraciones neuropatológicas (macroscópicos y microscópicos) en diferentes regiones de cerebro derivadas de la activación de la ruta celular de estrés, apoptosis y necrosis, afectando principalmente células piramidales del hipocampo y la corteza cerebral, el tálamo, y células de Purkinje de la corteza cerebelar. Por lo que, se ha tomado como protocolo de rutina la evaluación de la actividad anticonvulsiva en modelos en los que se ven disminuidos los procesos inhibidores o favorecidos los excitadores.

4.1.2 Evaluación de la actividad anticonvulsiva y modelos experimentales

La excitotoxicidad es un mecanismo importante en el desarrollo de los procesos neurodegenerativos, la cual se da lugar por la constante sobreexcitación neuronal o por la presencia de alguna patología subyacente (p. ej., epilepsia, traumatismos, hipoxia, infecciones virales y bacterianas, hipertermia y cáncer, entre otras)^x caracterizada por la presencia de crisis convulsivas (mioclónicas, clónicas, tónicas, tónico-clónicas) así como convulsiones no convulsivas (ausencias típicas y atípicas).

El estudio de aquellas condiciones patológicas que se caracterizaban por la presencia de crisis convulsivas, como en la epilepsia, comenzó con las observaciones realizadas por Hipócrates en el siglo IV a. C., siendo el primero en intentar explicar la epilepsia a través de la experimentación en modelos animales (sospechando como culpable algún fluido en el cerebro de la cabra epiléptica). Posteriormente, a partir del siglo IX, se encontró que existía propensión de los animales para las convulsiones en desarrollo (1869), se estudiaron en particular las convulsiones espontáneas en los

perros (John Hughlings Jackson), se encontró que la estimulación eléctrica directa de la corteza en varios mamíferos generó episodios de convulsiones clónicas que se asemejaban a la epilepsia humana (David Ferrier), y poco después, comenzó la experimentación con los proconvulsivantes químicos (Wiedeman, 1877). Por lo que el uso de modelos animales de convulsión ha servido como una importante herramienta en el estudio de enfermedades crónicas como la epilepsia, desde sus causas hasta sus consecuencias, así como en la identificación de nuevos fármacos con actividad anticonvulsiva, de modo que también se les conoce como “modelos experimentales de epilepsia”.

En general, estos modelos animales tratan de emular las condiciones patológicas en el humano, es decir, la semiología (alteración de la conducta, la actividad motora o sensorial derivada de las convulsiones), descargas electrográficas anormales (actividad neuronal anormal excesiva), refractariedad médica. Por lo que los modelos animales deben reflejar los factores neuro-anatómicos, bioquímicos y genéticos que sustentan las convulsiones que se están estudiando.

Históricamente, el estudio preclínico tradicional de las propiedades anticonvulsivas ha sido a través de pruebas clásicas de convulsión inducida por electrochoque máximo agudo (MES) y pentilentetrazol (PTZ) en modelos animales; debido a que estos son simples de usar y permiten obtener resultados reproducibles, como los que se emplean para el estudio de la epilepsia. El primer estudio realizado para identificar fármacos antiepilépticos (FAE) se llevó a cabo en la década de 1940, evaluando la actividad anticonvulsivante de la fenitoína en gatos. Actualmente, son utilizados roedores no epilépticos para estos modelos; con el objetivo de buscar nuevos FAE, así como para estudiar su mecanismo de acción, eficacia, tolerancia y los efectos secundarios de estos compuestos.

Actualmente, se han clasificado a los modelos animales de convulsión al menos en tres categorías con respecto a la duración del protocolo de inducción de las crisis convulsivas (agudos y crónicos), por el agente causal de la actividad epiléptica (sustancia química, estímulo físico, alteración metabólica o mutación genética) o por el tipo de actividad epiléptica que se genera (focal o generalizada; cortical o límbica; clónicas o tónicas; estado epiléptico; etc.). Sin embargo, el uso de estos modelos comúnmente es una combinación de los criterios antes mencionados, de acuerdo con el enfoque de cada estudio, tal como lo muestra la tabla 9.

Tabla 9. Modelos experimentales d epilepsia.

Tipo Agente Pro-Epiléptico	Agente Causante	Tipo de Actividad Epiléptica Generada	Tipo Protocolo (Duración)	Edad de las Ratas
Químico	Ácido kaínico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, status epilepticus	Agudo, crónico	Adultas y en desarrollo
	Pilocarpina	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, status epilepticus	Agudo, crónico	Adultas y en desarrollo
	Pentilentetrazol	Crisis clónico-tónicas generalizadas	Agudo	Adultas y en desarrollo
		Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Crónico (kindling químico)	Adultas
		Crisis de ausencia	Agudo	Adultas
	Glutamato monosódico	Crisis tónico-clónicas generalizadas	Agudo Crónico	En desarrollo
	Fluoroetil	Crisis clónico-tónicas generalizadas	Agudo	En desarrollo
Toxina tetánica	Crisis secundariamente generalizadas	Crónico	Adultas y en desarrollo	
Físico	Kindling eléctrico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Crónico	Adultas y en desarrollo
	Generación de postdescargas corticales	Crisis parciales complejas o crisis mioclónicas	Agudo	En desarrollo
	Electrochoques	Crisis mioclónicas Crisis tónico-clónicas	Agudo	Adultas y en desarrollo
	Hipertermia	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Agudo Crónico	En desarrollo
	Hipoxia	Crisis clónico-tónicas	Agudo	En desarrollo
Genético	Ratas genéticamente propensas a crisis de ausencia GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg)	Crisis de ausencia	*Descargas electrográficas tipo espiga onda espontáneas	Jóvenes (1 mes de edad) y adultas
	Ratas genéticamente propensas a crisis de ausencia WAG/Rij (Wistar Absence Glaxo rat)			
	Ratas Genéticamente Propensas a la Epilepsia GEPR (Genetically Epilepsy-Prone Rats)	Crisis convulsivas primaria o secundariamente generalizadas (clónicas/tónico-clónicas)	Sonido	Adultas

(Tomado de Zavala y López, 2011)

4.1.3 Modelos químicos: inducción de convulsión con pentilentetrazol (PTZ)

Los modelos químicos consisten en la inducción de actividad epiléptica (convulsiva o no) como consecuencia a la administración de sustancias químicas excitadoras (principalmente análogos glutamatérgicos) o agentes que disminuyen o bloquean la neurotransmisión inhibitoria (principalmente antagonistas GABAérgicos o glicinérgicos).

Algunos de estos agentes químicos convulsivantes (p. ej., absenta o ajenjo, estricnina, penicilina) están siendo gradualmente reemplazados por otros agentes como el PTZ, para explorar la relación que existe entre la generación de la convulsión y los sistemas de neurotransmisores.

4.1.3.1 Crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol (PTZ)

El pentilentetrazol (metrazol, α,β -ciclopentametilentetrazol, PTZ) (Fig. 32) se utiliza como agente convulsivante desde 1926 (Hildebrandt, 1926). Por su bajo costo y su fácil manejo, el empleo del modelo PTZ ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo y la evaluación de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante.

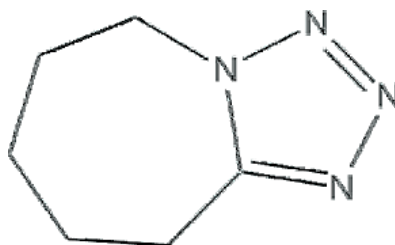


Figura 32. Estructura química del pentilentetrazol (Ramos-Morales *et al.*, 2012).

Actualmente, PTZ es el modelo de inducción química de convulsiones de primera elección para estudiar las convulsiones generalizadas (crisis de ausencia y clónico-tónicas) similares a las que se presentan en humanos; sin embargo, este modelo no permite diferenciar la efectividad de los fármacos entre las crisis tónico-clónicas y las crisis de ausencia, especialmente cuando se toma como punto final la presencia de crisis tónicas.

El PTZ es un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A, que interacciona con el sitio de unión a picrotoxina (Fig. 33), bloqueando al canal de Cl⁻ y, por lo tanto, disminuyendo la actividad inhibitoria en SNC ¹. Aunque el efecto del PTZ en el cerebro es inespecífico, se sugiere que la expresión de las crisis inducidas por este fármaco, esta mediada por estructuras cerebrales como la neocorteza, el hipocampo, regiones del diencefalo y del tallo cerebral, incluyendo la formación reticular, el bulbo raquídeo y la sustancia gris central.

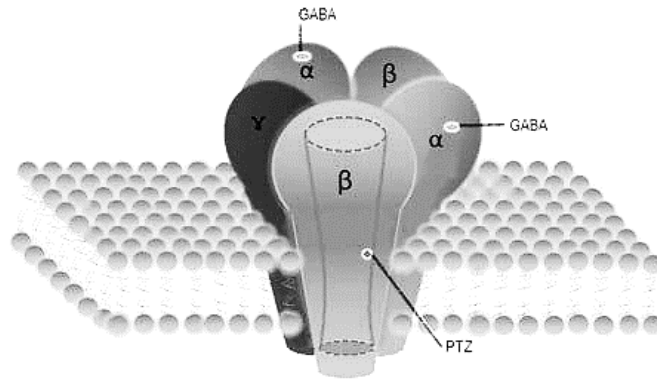


Figura 33. Modelo propuesto del sitio de la unión de PTZ en el receptor GABA_A (Ramos-Morales *et al.*, 2012).

El patrón convulsivo causado por el PTZ es dependiente de la dosis y la edad. La aplicación sistémica de dosis bajas de PTZ (20–30 mg/kg) producen crisis de ausencia, y las dosis altas (40 a 100 mg/kg) producen crisis convulsivas del tipo clónico-tónicas generalizadas. Puede ser administrado en ratas neonatas y ratones adultos¹, en donde las crisis tónico-clónicas son observadas durante todo el desarrollo mientras que las crisis clónicas son limitadas durante las dos primeras semanas postnatales.

El patrón conductual consiste inicialmente en movimientos faciales, piloerección y cola erguida, seguida de espasmos musculares provenientes de la musculatura del cuello y tronco que se propagan a las extremidades (*mioclonus*); posteriormente, el animal pierde la postura y se desencadena la fase clónica que es característica por una serie de movimientos involuntarios bruscos seguidos de la crisis tónica (hiperextensión de las extremidades).

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto anticonvulsivo que pudieran tener *escamonina I* y *tiriantina C* en un modelo murino de inducción con pentilentetrazol.
- Evaluar el efecto neuroprotector que pudieran tener *escamonina I* y *tiriantina C* sobre la corteza e hipocampo de ratón a nivel histológico.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Animales

Como modelo experimental se utilizaron ratones hembra adultos (*Mus musculus*) de la cepa CD1 de entre 20-30 gramos de peso corporal (Buznego y Pérez, 2002) para la evaluación de la actividad anticonvulsivante y el posterior análisis histológico de cada cerebro. Los especímenes fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), mantenidos bajo condiciones controladas (12 horas de luz / 12 horas de oscuridad a 25 °C, y libre acceso a agua y comida). El protocolo de manejo de los animales en el laboratorio se realizó siguiendo los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

4.3.2 Evaluación farmacológica

Para la evaluación del efecto neuroprotector de escamonina 1 y tiriantina C (Fig. 34) se utilizará pentilentetrazol (PTZ) como agente inductor de daño neuronal que genera un evento convulsivo en un modelo *in vivo* (Ramos *et al.*,2012).

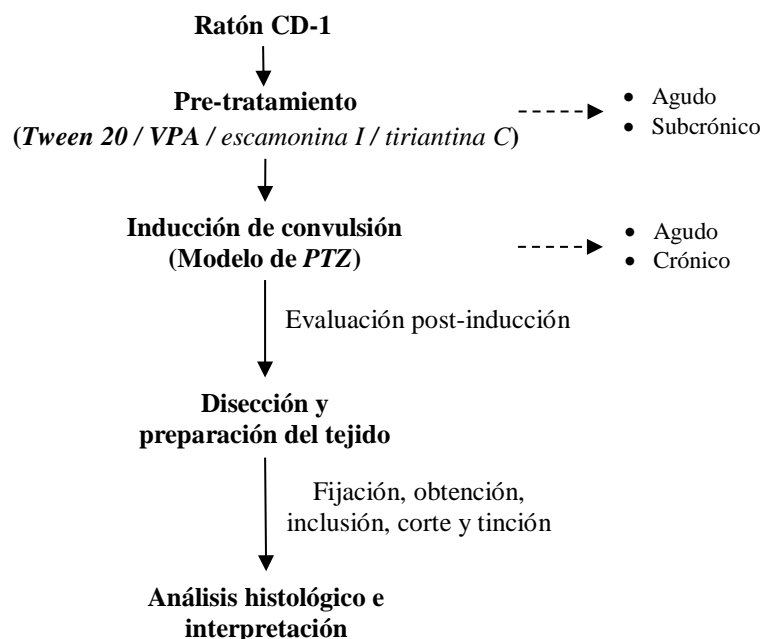


Figura 34. Esquema general de la evaluación del efecto neuroprotector.

4.3.2.1 Evaluación de la actividad anticonvulsiva

Los ratones utilizados fueron distribuidos individualmente en jaulas de plexiglás (25 × 15 × 10 cm) 2 horas antes del ensayo, restringiendo el acceso al agua y alimento (Buznego y Pérez, 2002). La vía de administración, de todas las sustancias usadas en la evaluación de la actividad anticonvulsiva, fueron por inyección intraperitoneal (i.p.); ajustado las dosis de acuerdo con el peso de cada ratón antes de iniciar cada ensayo (Kupferberg *et al.*, 1992).

Inicialmente, se buscó estandarizar la prueba para establecer las concentraciones de PTZ necesarias para la inducción de daño, monitoreando el efecto generado (presencia y frecuencia de crisis convulsivas clónico-tónica, % de muerte) después de su administración de cada dosis de PTZ (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto proconvulsivante de PTZ.

PTZ [mg / Kg]	Convulsión (#)	Latencia a la convulsión (s)	Muerte (%)
25	0	NA	0
40	0	NA	0
50	1.8 ± 0.2	212.5 ± 41.8	0
65	3.4 ± 0.4	120.0 ± 6.3	0
70	2.8 ± 0.6	98.0 ± 16.5	33.3
80	4 ± 0.6	52.3 ± 11.0	100

Se muestran las mediciones realizadas en la evaluación de la actividad proconvulsivante inducida por la administración de PTZ vía i.p. a diferentes concentraciones. Los grupos fueron monitoreados 30 minutos post-inducción con PTZ y a las 24 horas siguientes. Los valores son los promedios ± SEM de 5 experimentos independientes por grupo. *NA* = no aplica.

De acuerdo con la literatura y la estandarización realizada, 70 mg / kg de PTZ es la dosis mínima que da lugar a la actividad convulsiva conductual aguda en todos los animales sin generar el 100% de la muerte (daño agudo) y la de 40 mg / kg de PTZ (dosis diaria por un periodo de 3 – 4 semanas) para protocolos de sensibilización en los que se busca generar un estado epiléptico (daño crónico); por lo tanto, estas dosis se usaron para probar la actividad anticonvulsiva de las resinas glicosídicas, escamonina 1 y tiriantina C, en esquemas agudos y subcrónicos.

En los tres esquemas experimentales, los grupos de ratones fueron pretratados (respectivamente con Vehículo, VPA, escamoina 1 y tiriantina C) 30 minutos antes de la administración del PTZ; monitoreando el comportamiento de cada animal (Ariza *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2007) durante los 30 minutos posteriores a la inducción de convulsión y a las 24 horas, tomando en cuenta:

- Latencia a la convulsión: Tiempo transcurrido desde la inyección del fármaco proconvulsivante hasta la aparición de la primera crisis convulsiva, que para PTZ corresponde a la aparición de la primera convulsión clónico-tónica.
- Número de convulsiones: Frecuencia de eventos convulsivos clónico-tónicos post-inducción con PTZ.
- Latencia a la muerte: Tiempo transcurrido desde la inyección del fármaco proconvulsivante hasta la muerte del espécimen.
- % de mortalidad: Frecuencia relativa del número de individuos muertos post-inducción con PTZ.

Además, para el caso del modelo de “PTZ-kindling”, se monitoreo el progreso de la sensibilización con PTZ durante todo el tratamiento, tomando en cuenta la siguiente escala de comportamiento:

- *Etapa 0* → Ausencia de reacciones.
- *Etapa 1* → Lamer las piernas y la cola.
- *Etapa 2* → Disminución de la actividad motora.
- *Etapa 3* → Presencia de espasmos involuntarios (fase mioclónica).
- *Etapa 4* → Presencia de al menos una crisis convulsiva clónico-tónica
- *Etapa 5* → Presencia de más de una crisis convulsiva clónico-tónica (estado epiléptico).
- *Etapa 6* → Muerte generada por crisis convulsivas clónico-tónicas repetidas y fuertes.

Al término de la evaluación, se consideró como indicativo de “*actividad anticonvulsivante y neuroprotectora a nivel fisiológico*” a aquel compuesto / dosis que evitó la aparición de crisis convulsivas clónico-tónicas (Ariza *et al.*, 2006; Kupferberg *et al.*, 1992) o que disminuyó su severidad.

4.3.2.2 Condiciones experimentales

La evaluación farmacológica se llevó a cabo utilizando dos modelos *in vivo* de convulsión con PTZ (Tabla 11): 1) inducción aguda y 2) sensibilización crónica o *Kindling* (40.0 mg/kg).

Tabla 11. Condiciones experimentales para la evaluación de la actividad anticonvulsiva.

Modelo de convulsión	Pretratamiento	Descripción
<u>PTZ-Agudo</u>	<u>Agudo</u>	Los ratones serán dosificados con escamonina 1 / tiriantina C (40, 80 y 120 mg/kg, i.p.), vehículo (tween 20 al 2.5% + metanol, 90% /10%, i.p.) o VPA (300 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de la inducción de convulsión con PTZ (70 mg/kg, i.p.).
<u>PTZ-Agudo</u>	<u>Subcrónico</u>	Los ratones serán dosificados con escamonina 1 / tiriantina C (40 mg/kg, i.p.), vehículo (tween 20 al 2.5% + metanol, 90% /10%, i.p.) o VPA (300 mg/kg, i.p.) durante 8 días; 30 minutos después de la última inyección se realizará la inducción de convulsión con PTZ (70 mg/kg, i.p.).
<u>PTZ-Crónico</u>	<u>Subcrónico</u>	Los ratones serán sensibilizados diariamente con PTZ (40 mg/kg, i.p.) hasta que se presenten convulsiones tónico-clónicas espontáneas. Posteriormente, se hará una dosificación diaria con escamonina 1 / tiriantina C (40.0 mg/kg, i.p.), vehículo (tween 20 al 2.5% + metanol, 90% /10%, i.p.) o VPA (300 mg/kg, i.p.) y la inducción de convulsión respectiva con PTZ (40 mg/kg, i.p.) durante 8 días; siempre monitoreando durante los 30 minutos post-inducción de convulsión diaria con PTZ.

En el primer modelo, fueron inyectados grupos de 6 ratones CD1 con diferentes dosis de cada compuesto en esquema agudo (30 minutos, 40-80-120 mg/kg, i. p.) y subcrónico (8 días, 40 mg/kg, i. p.) en, monitoreándolos por 30 minutos post-inducción con PTZ (70 mg / kg, i. p.).

En el caso del modelo de *daño crónico*, antes de la evaluación farmacológica, fueron inyectados diariamente grupos de 6 ratones CD1 con una dosis sub-convulsivante de PTZ (40 mg / kg, por 30 días, i. p.) para inducir un estado epiléptico en los especímenes. Después, se utilizaron los grupos sensibilizados para la evaluación farmacológica, pretratando a los ratones con escamonina 1 y tiriantina C siguiendo un esquema subcrónico, manteniendo la inducción de daño diario con PTZ (40 mg / kg, i. p.), y monitoreándolos por 30 minutos post-inducción.

Para las evaluaciones se usaron: Tween 20 al 2.5 % / metanol (90 % / 10 %) como control negativo o vehículo, valproato de sodio (VPA, 300 mg/kg) como control positivo, PTZ como agente proconvulsivante, y las resinas glicosídicas (escamonina 1 y tiriantina C) como compuestos a evaluar. El PTZ fue disuelto en agua estéril y el VPA y los glicolípidos en vehículo.

4.3.2.3 Procesamiento histológico de los tejidos

Después de los ensayos de anticonvulsión se realizó la preparación, fijación y disección del tejido para el análisis histológico de cortes sagitales de cerebro (Fig. 35), tal como lo describe el anexo E.

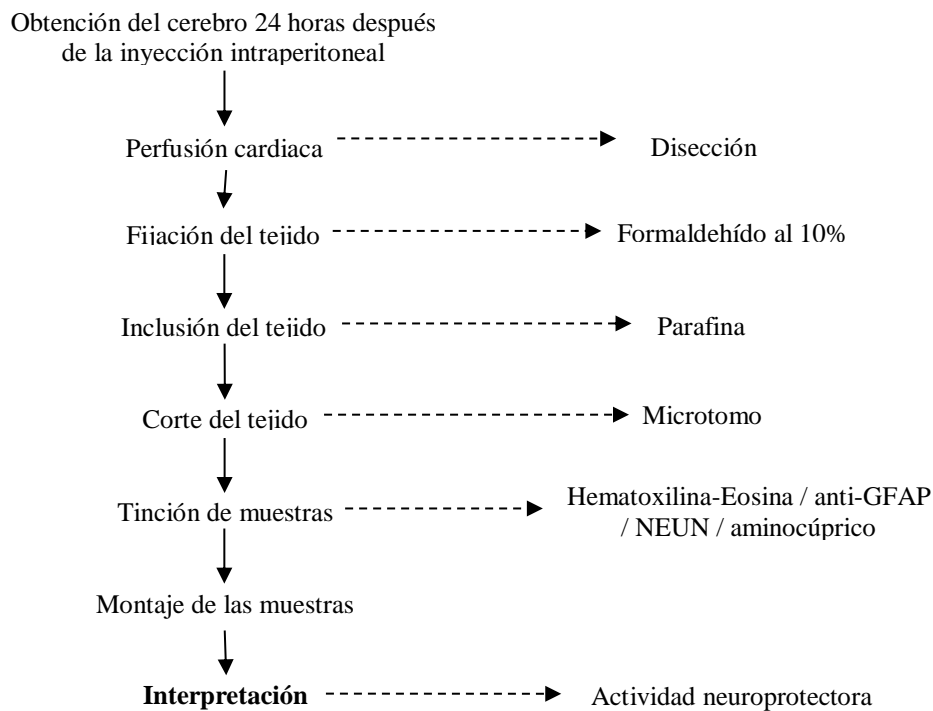


Figura 35. Esquema general de la técnica histológica.

4.3.2.4 Evaluación histológica

Para la evaluación de los cambios celulares (morfología neuronal) y el grado de neurodegeneración del tejido, fueron seleccionados 3 grupos de 8 secciones de cada condición para el proceso de tinción y el análisis histológico. Para ello, las muestras se desparafinaron y rehidrataron (Anexo F: 1) antes de iniciar el protocolo de tinción.

El proceso de tinción se llevó a cabo siguiendo 3 protocolos histoquímicos (Anexo F: 2-4): 1) hematoxilina-eosina o H-E (morfología celular), 2) plata-amino-cúprico (detección temprana de neurodegeneración), e 3) inmunohistoquímico para GFAP (gliosis) y Neu-N (viabilidad celular). Una vez teñidas las muestras, se volvieron a deshidratar y aclarar para realizar su montaje usando resina DPX.

Por último, con el fin de identificar el grado de daño que pudiera mostrar el tejido, se realizó la observación de los cortes histológicos con ayuda de un microscopio óptico LEICA DM500 (Leica Microsystems Inc.) a 400x y 1000× de magnificación. Para las observaciones, se analizó la corteza cerebral (Cx III y/o Cx V) y algunas áreas del hipocampo (DG, CA1, and CA3); tomándose en cuenta a aquellos efectos celulares que pudieran haber sido generados por la presencia de las crisis convulsivas o por los compuestos administrados, tales como: muerte celular, alteraciones en la morfología neuronal y/o activación y proliferación de células gliales (Huang *et al.*, 2002).

Con las muestras teñidas H-E se evaluó cuantitativamente la integridad neuronal, expresándose en número relativo o porcentual de células conservadas (% CC). Para el resto de las tinciones se realizó una evaluación cualitativa, identificándose: 1) la presencia o ausencia de los grupos celulares que muestren depósitos de microcristalización de cromato de plata correspondiente con el grado de neurodegeneración, 2) la presencia o ausencia de astrocitos GFAP (+) o activados correspondientes con el grado de astrogliosis, y 3) la presencia o ausencia de neuronas Neu-N (+) correspondientes con el grado de viabilidad celular.

4.3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los conteos celulares fueron analizados usando la plataforma estadística GraphPad Prism (Prism 6 para Windows versión 6.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA), analizándolos bajo las pruebas de ANOVA de 1 vía y post hoc de Bonferroni. Para ello, se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$, expresando los datos como la media \pm error estándar ($\bar{X} \pm$ SEM).

4.4 Resultados

4.4.1 Evaluación farmacológica

Se correlacionó la actividad anticonvulsiva (prueba conductual) en ratones previamente dosificados con escamonina 1 y tiriantina C con su efecto a nivel histológico en corteza cerebral e hipocampo, bajo dos esquemas de administración (agudo y subcrónico) en modelos de convulsión con PTZ, para entender obtener más información de sus propiedades neuroprotectoras.

4.4.1.1 Efecto anticonvulsivo de escamonina 1 y tiriantina C

A. Administración “aguda”

El grupo control administrado con “Vehículo + PTZ” mostró 0 % de protección, 98 ± 16.5 segundos de latencia, 2.8 ± 0.6 convulsiones tónico-clónicas y 23.3 % de muerte. Como control positivo se utilizó VPA (300 mg/kg) como referencia del 100 % de protección contra la inducción de convulsión y 0 % de muerte, donde se observó piloerección y disminución de la actividad motora en la mayoría de los ratones de este grupo.

Los grupos experimentales fueron dosificados a tres diferentes dosis de escamonina 1 o tiriantina C (40, 80 y 120 mg/kg). Ambos compuestos tuvieron un efecto dependiente de la dosis con respecto a la aparición de las crisis convulsivas (número y latencia) inducidas por PTZ (Tabla 12), mostrando 16.7 %, 66.7 % y 100 % de protección a la convulsión, respectivamente. Sin embargo, se presentó un 100 % de muerte a las 24 horas posteriores a la administración de la dosis de 120 mg/kg de ambos compuestos.

Por lo anterior, también se evaluó el efecto que tenía la administración de escamonina 1 y tiriantina C en ausencia de inducción de convulsión con PTZ. Se observó piloerección y comportamiento letárgico con disminución de la actividad motora en los ratones, lo cual resulta consistente con el efecto sedante que se les atribuye a estos compuestos.

Sin embargo, tiriantina C produjo un 33.3 % de muerte a la dosis de 80 mg/kg a las 24 horas posteriores a la administración; y para las dosis de 120 mg/kg, el efecto depresor en sistema nervioso provocó el 100% de muerte antes de las 24 horas posteriores a la dosificación de ambos compuestos.

Tabla 12. Actividad anticonvulsiva de *escamonina 1* y *tiriantina C* en un modelo murino agudo.

Condición	Comportamiento	Convulsiones (#)	Latencia (segundos)	Muerte (%)
<i>Vehículo + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, > de 20 espasmos, > de 1 convulsión tónico-clónica violenta, muerte.	2.8 ± 0.6	98 ± 16.5	23.3 *
<i>Escamonina 1 (40) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos, > de 1 convulsión tónico-clónica.	2.0 ± 0.6	429 ± 274.6	0
<i>Escamonina 1 (80) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos, 1 convulsión tónico-clónica de menor intensidad.	0.7 ± 0.5	1254.8 ± 344.8	0
<i>Escamonina 1 (120) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos. Muerte a las 24 horas post-inducción.	0	1800 ± 0	100 **
<i>Tiriantina C (40) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos, > de 1 convulsión tónico-clónica.	1.8 ± 0.5	472.8 ± 265.7	0
<i>Tiriantina C (80) + PTZ</i>	Actividad motora disminuida, espasmos, 1 convulsión tónico-clónica de menor intensidad.	0.5 ± 0.3	1403.8 ± 251.6	0
<i>Tiriantina C (120) + PTZ</i>	Actividad motora disminuida, espasmos. Muerte a las 24 horas post-inducción.	0	1800 ± 0	100 **

Se muestran las observaciones y mediciones realizadas en la evaluación de la actividad anticonvulsiva de escamonina 1 y tiriantina C administrados vía i. p. a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) frente a la inducción de convulsión con PTZ (70 mg/kg). Los valores son los promedios ± SEM de 6 experimentos independientes por grupo. * muerte antes de 30 minutos post-inducción con PTZ, ** muerte después de 30 minutos post-inducción con PTZ y antes de las 24 horas siguientes.

B. Administración “subcrónica”

El grupo control con inducción de convulsión tónico-clónica con 70 mg/kg de PTZ, se tomó como referencia con respecto a la protección (0 %), latencia (143.5 ± 32.2 segundos) y número de convulsiones (2.2 ± 0.3 , tónico-clónica). Como control positivo se utilizó VPA (300 mg/kg) como referencia del 100 % de protección contra la inducción de convulsión tónico-clónica con PTZ (70 mg/kg). Observándose piloerección y disminución de la actividad motora en la mayoría de los ratones los primeros días de administración, y comportamiento ansioso e hiperactivo (aumento la actividad exploratoria y saltos) los últimos días.

Para evaluar el efecto anticonvulsivo de escamonina 1 y tiriantina C, estos fueron administrados a una dosis diaria de 40 mg/kg por 8 días. Durante las dosificaciones diarias mostraron comportamiento letárgico con disminución de la actividad motora y en algunos ratones se observó piloerección que en transcurso de los días dejó de mostrarse. Ambos compuestos en general disminuyeron la sintomatología inducida por PTZ (Tabla 13) durante el monitoreo de 30 minutos.

Tabla 13. Actividad anticonvulsiva de *escamonina 1* y *tiriantina C* en un modelo murino subcrónico.

Condición	Comportamiento	Convulsiones (#)	Latencia (segundos)	Muerte (%)
<i>Vehículo + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, > de 20 espasmos, > de 1 convulsión tónico-clónica violenta.	2.2 ± 0.3	143.5 ± 32.2	0
<i>Escamonina 1 (40) + PTZ</i>	Lamida de patas, espasmos, > de 1 convulsión tónico-clónica.	2.3 ± 1.0	456.8 ± 161.7	0
<i>Tiriantina C (40) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos, al menos 1 convulsión tónico-clónica.	0.7 ± 0.3	1038.7 ± 342.6	0

Se muestran las observaciones y mediciones finales realizadas en la evaluación de la actividad anticonvulsiva de escamonina 1 y tiriantina C administrados vía i.p. a una dosis diaria de 40 mg/kg por ocho días, frente a la inducción de convulsión con PTZ (70 mg/kg) al término. Los valores son los promedios \pm SEM de 6 experimentos independientes.

Escamonina 1 y tiriantina C mostraron 36.4 % y 68.2 % de protección a la convulsión, respectivamente; aumentando los tiempos de latencia con respecto al mostrado por el CN (Vehículo + PTZ) y sin presencia de muerte a los 30 minutos y 24 horas posteriores a la administración de los compuestos. La administración de escamonina 1 y tiriantina C sin la inducción de convulsión con PTZ, únicamente generó piloerección y comportamiento letárgico con disminución de la actividad motora, consistente con el efecto sedante que se les atribuye a estos compuestos y similar al mostrado por la administración con VPA.

Por otro lado, el modelo de “PTZ-crónico” y pretratamiento subcrónico nos permite evaluar si la administración repetida de escamonina 1 y tiriantina C en condiciones que simulen el estado convulsivo crónico (epiléptico). Para esto, la evaluación se manejó en dos fases (Fig. 36): una de sensibilización y otra de evaluación farmacológica.

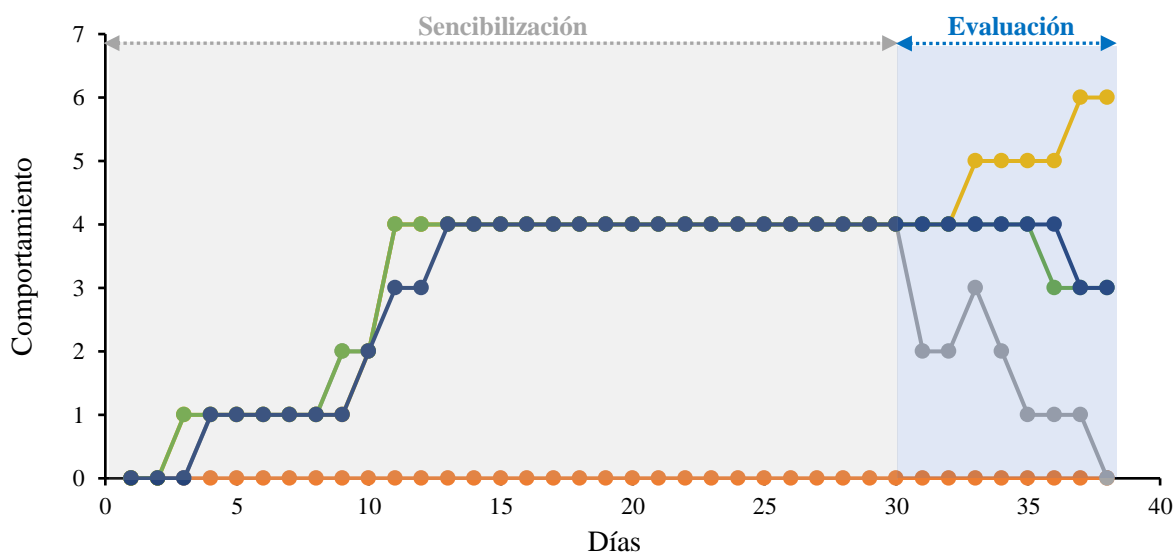


Figura 36. Modelo de “PTZ-crónico” y evaluación farmacológica de escamonina 1 y tiriantina C. Se muestra el comportamiento observado durante las fases de sensibilización (sombreado gris) y la fase de evaluación de la actividad anticonvulsiva de *escamonina 1* y *tiriantina C* (sombreado azul). Los valores representan observaciones realizadas de 6 experimentos independientes, tomando en cuenta el comportamiento mostrado por los ratones (0 = sin respuesta, 1= lamida de patas y cola parada, 2 = disminución de la actividad motora, 3= presencia de espasmos involuntarios, 4 = presencia de una convulsión, 5 = presencia de más de una convulsión, 6 = estatus convulsivo, y 7 = muerte). Vehículo + H₂O (●), Vehículo + PTZ (●), VPA + PTZ (●), Escamonina 1 + PTZ (●), y Tiriantina C + PTZ (●).

En la fase de sensibilización, los ratones (CD-1) fueron administrados con una dosis subconvulsivante diaria de PTZ (40 mg/kg, vía i.p.) durante un periodo de 30 días, hasta alcanzar el

estatus epiléptico; y en la fase de evaluación farmacológica, se administraron los compuestos a evaluar (diaria, vía i.p.) 30 minutos previos a la estimulación con PTZ durante 8 días. El monitoreo del comportamiento de cada grupo de ratones se realizó durante 30 minutos y a las 24 horas post-inducción de convulsión con PTZ. Como grupo control en este modelo, se preparó un grupo CN (Vehículo + H₂O) sin sensibilizar con PTZ, para descartar el efecto que pudiesen tener el agua y el vehículo en el proceso de sensibilización y de evaluación de la actividad anticonvulsiva, respectivamente.

Para la evaluación del efecto anticonvulsivo fueron utilizados cuatro grupos previamente sensibilizados con PTZ. Un grupo CN (Vehículo + PTZ) al que se le administró vehículo (vía i. p.) previa inducción con PTZ, que sirvió como referencia de la ausencia de protección (0 %), número de convulsiones tónico-clónicas (3.4 ± 2.2), y latencia (242.0 ± 41.3 segundos) presentes en el estado de daño crónico. Para el control positivo o CP (VPA + PTZ) se administró un grupo con VPA (300 mg/kg, diario, 8 días, vía i. p.) previa inducción con PTZ como referencia del 100 % de protección (ausencia de convulsión desde el primer día). Al principio de la dosificación se observó piloerección y disminución de la actividad motora en la mayoría de los ratones de este grupo. Mostrando un aumento la actividad exploratoria conforme se transcurría la administración diaria de VPA.

Tabla 14. Efecto anticonvulsivo de *escamonina 1* y *tiriantina C* en un modelo de “PTZ-crónico”.

Condición	Comportamiento	Convulsiones (#)	Latencia (segundos)	Muerte (%)
<i>Vehículo + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, > de 20 espasmos, > de 1 convulsión violenta, estatus epiléptico.	4.4 ± 1.7	226.6 ± 40.8	0
<i>Escamonina 1 (40) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos.	0	1800 ± 0	0
<i>Tiriantina C (40) + PTZ</i>	Lamida de patas, actividad motora disminuida, espasmos.	0	1800 ± 0	0

Se muestran las observaciones y mediciones finales realizadas en la evaluación de la actividad anticonvulsiva de *escamonina 1* y *tiriantina C* administrados vía i.p. a una dosis diaria de 40 mg/kg por ocho días a ratones previamente sensibilizados con PTZ a dosis subconvulsiva (40 mg/kg, por 30 días), monitoreados 30 minutos post-inducción de convulsión con PTZ (40 mg/kg) al término. Los valores son los promedios \pm SEM de 6 experimentos independientes.

En los ensayos con los compuestos, se utilizaron dos grupos de ratones (escamonina-1 + PTZ y tiriantina-C + PTZ) administrados con una dosis 40 mg/kg (diaria, 8 días, vía i. p.) previa inducción con PTZ. Conforme se realizaban las dosificaciones diarias la sintomatología disminuyó hasta alcanzar un 100 % de protección a la inducción de convulsión con PTZ, mostrando solo un comportamiento letárgico con disminución de la actividad motora y pocos espasmos (Tabla 14).

4.4.1.2 Daño neuronal en corteza e hipocampo

A. Administración “aguda”

La figura 37 muestra el efecto que tiene la administración i. p. de escamonina 1 o tiriantina C en ratones sin inducción a convulsión sobre el *porcentaje de células conservadas* (%CC).

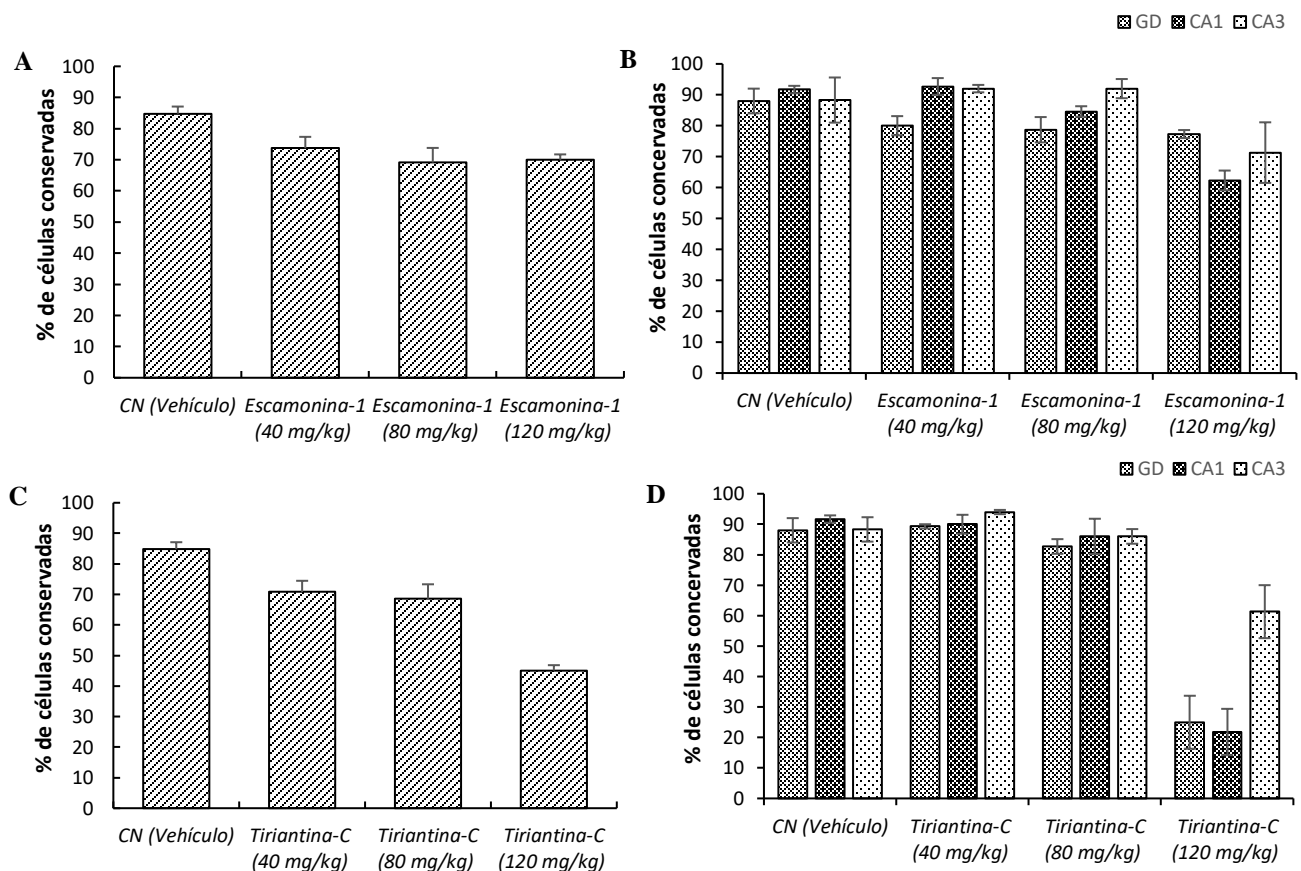


Figura 37. Efecto de escamonina 1 y tiriantina C sobre tejido cerebral de ratón. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamonina 1* (A y B) y *tiriantina C* (C y D) a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (A y C) e hipocampo (B y D) cerebral de ratón teñidos con hematoxilina – eosina. Los valores son los porcentajes promedio \pm SEM obtenido del conteo celular de 30 campos observados. ANOVA y Bonferroni ($p < 0.05$).

En el grupo “CN (vehículo)” no mostró un efecto aparente sobre la morfología celular en la corteza (84.8 %CC) e hipocampo (88 %CC en GD, 91.7 %CC en CA1 y 88.3 %CC en CA3), observándose neuronas típicas de bordes redondeados con núcleo y nucléolo definido, y sin presencia de edema intersticial. Los grupos dosificados con escamonina 1 (40, 80 y 120 mg/kg) mostraron una ligera disminución en el %CC en corteza (73.7 %, 69.1 % y 70 %, respectivamente) e hipocampo (GD: 80 %, 78.7 % y 77.3 %, CA1: 92.7 %, 84.6 % y 62.3 %, y CA3: 92 %, 92 % y 71.3 %, respectivamente) con respecto a la dosis. El efecto de las dosis de 80 y 120 mg/kg en corteza y de 120 mg/kg en hipocampo se mostraron significativamente diferentes al grupo “CN (vehículo)”, observándose en su mayoría neuronas típicas de bordes redondeados con núcleo y nucléolo definido, algunas neuronas picnóticas con retracción somática y ligero edema intersticial (Fig. 38).

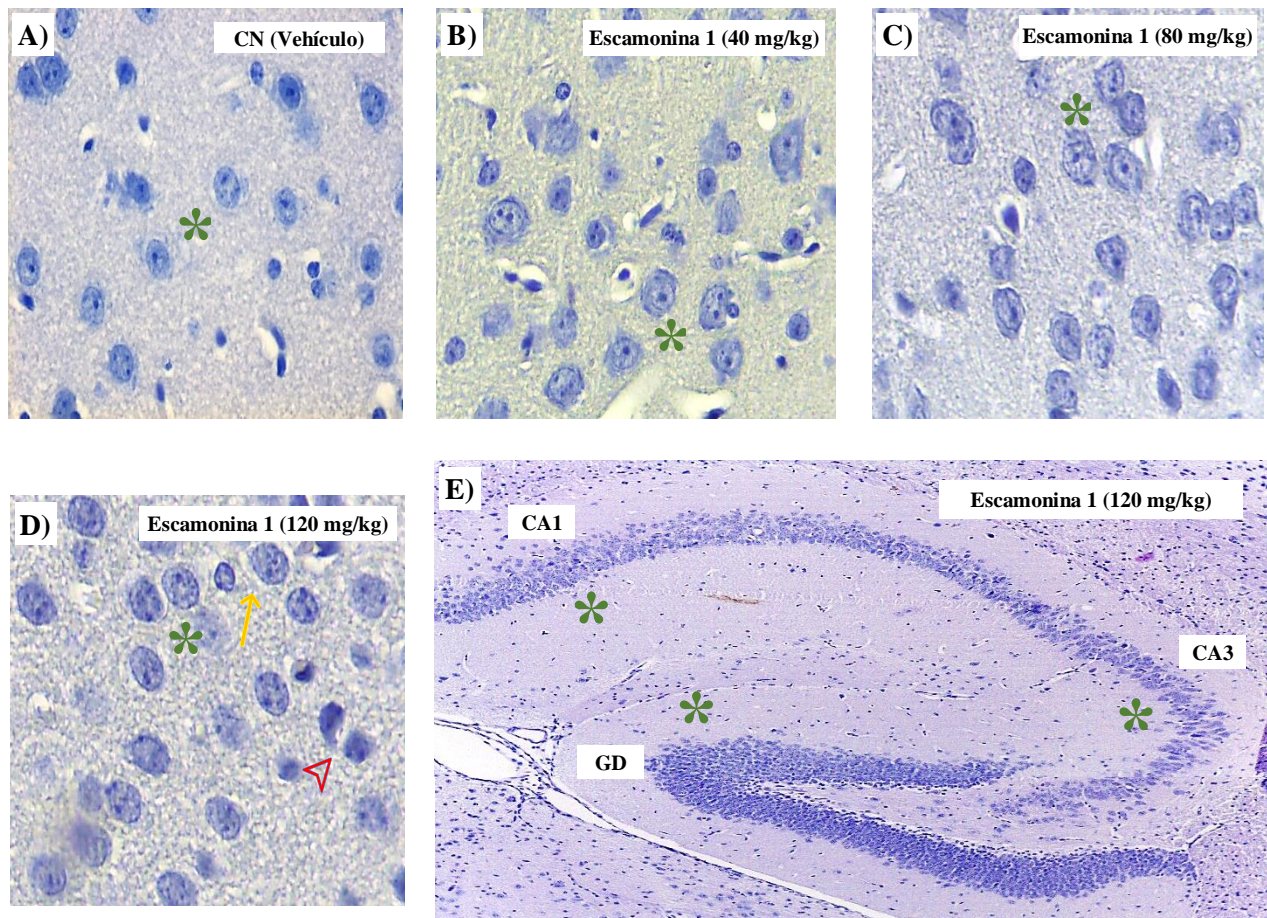


Figura 38. Efecto de la administración aguda de *escamonina 1*. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamonina 1* a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (B - D, 100X) e hipocampo (E, 40X) cerebral de ratón en comparación con el control (A, 100X). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

Para el caso de tiriantina C, las dosis de 40 y 80 mg/kg generaron una ligera disminución en el %CC en corteza (70.8 % y 68.6 %, respectivamente), pero no en hipocampo (GD: 89.3 % y 82.7 %, CA1: 90 % y 86 %, y CA3: 94 % y 86 %, respectivamente). La dosis de 120 mg/kg generó disminución significativa del %CC en corteza (45.1 %) e hipocampo (25 % en GD, 21.8 % en CA1 y 61.3 % en CA3) con respecto al grupo “CN (vehículo)”. Los cambios morfológicos neuronales encontrados en las tres dosificaciones incluyeron picnosis y/o retracción somática, además de mostrar diferentes grados de edema intersticial (ligero – marcado) dependiendo de la dosis, siendo la de 120 mg/kg la que tuvo efectos más severos (Fig. 39), tanto en corteza como en hipocampo.

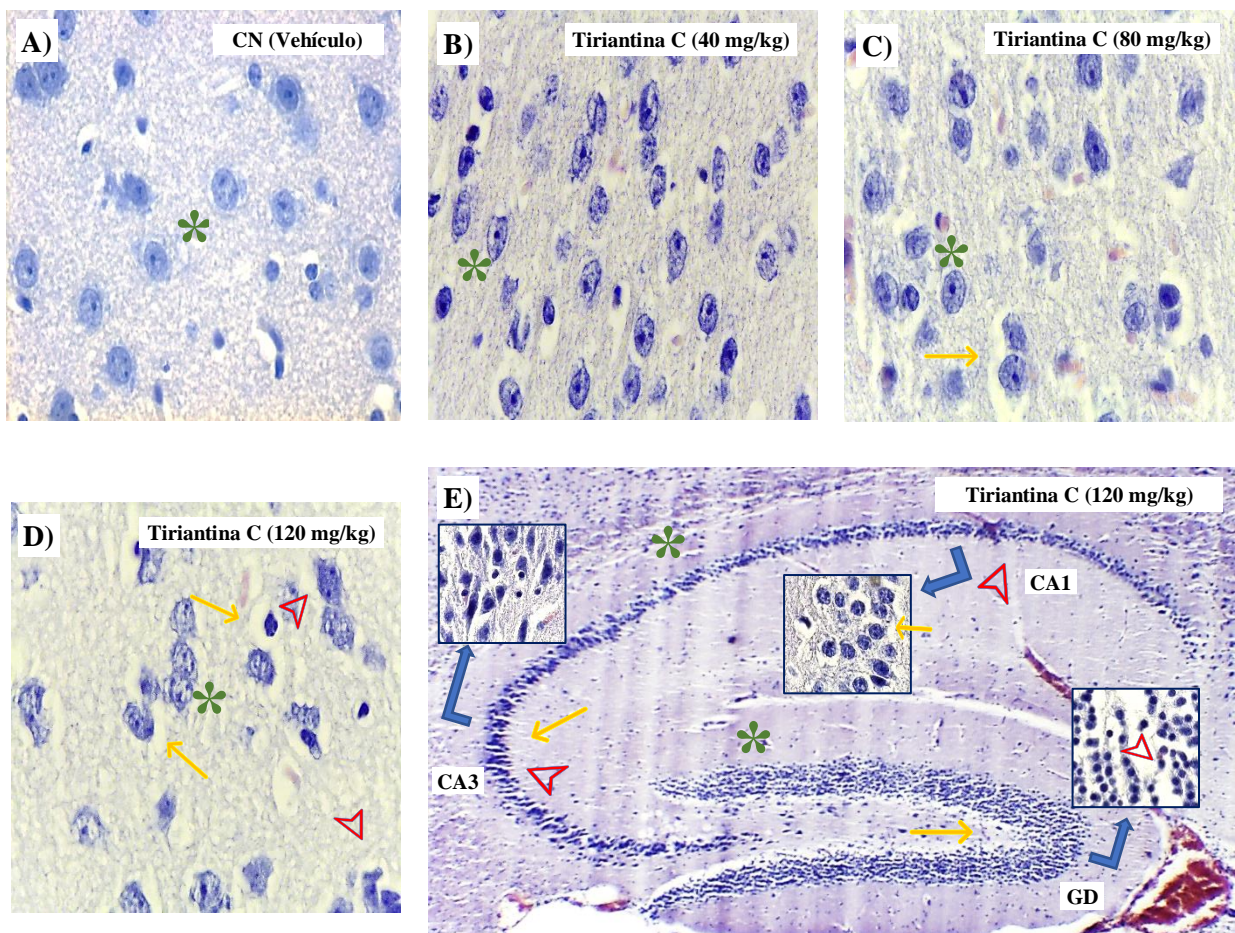


Figura 39. Efecto de la administración aguda de *tiriantina C*. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *tiriantina C* a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (B - D, 100X) e hipocampo (E, 40X) cerebral de ratón en comparación con el control (A, 100X). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

Posteriormente, se analizaron los cortes histológicos de corteza e hipocampo de las condiciones en donde hubo inducción de daño con PTZ: “CN (vehículo + PTZ)”, “CP (VPA + PTZ)”, “escamoina 1 + PTZ” y “tiriantina C + PTZ”. La figura 40 muestra el efecto que tiene la administración de los glicolípidos evaluados a las tres diferentes dosis ensayadas previamente (40, 80 y 120 mg/kg) bajo condiciones de inducción a convulsión con respecto al %CC en corteza y en hipocampo.

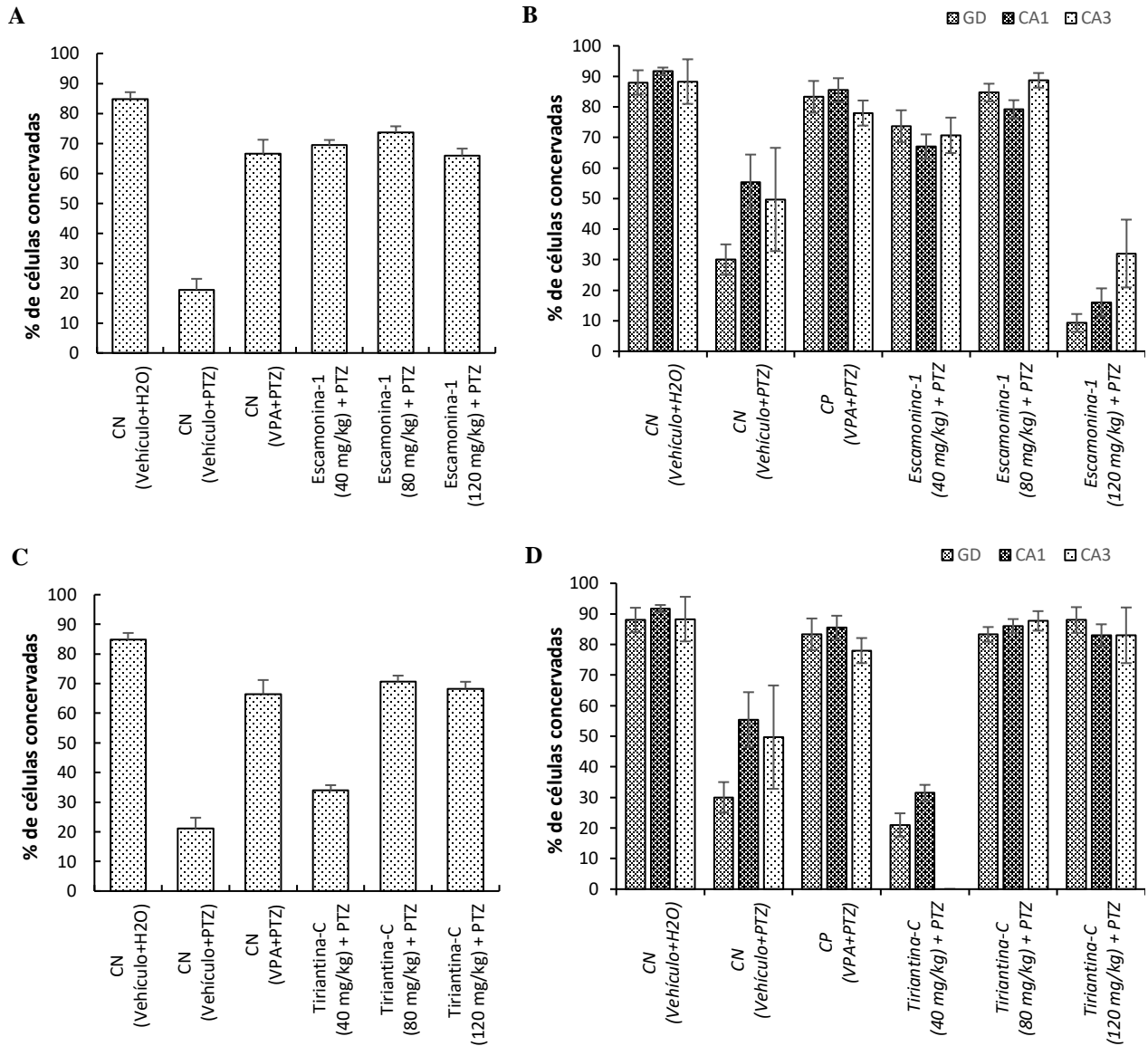


Figura 40. Efecto de escamoina 1 y tiriantina C sobre tejido cerebral en un modelo de inducción de daño con PTZ. Se muestra el efecto protector que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamoina 1* (A y B) y *tiriantina C* (C y D) a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (A y C) e hipocampo (B y D) cerebral en un modelo de inducción de daño con PTZ (70 mg/kg) en ratón. Los valores son los porcentajes promedio \pm SEM obtenido del conteo celular de 30 campos observados en muestras histológicas teñidas con hematoxilina – eosina. ANOVA y Bonferroni ($p < 0.05$).

La administración de PTZ (70 mg/kg) disminuyó significativamente el %CC de en corteza (21.1 %) e hipocampo (30 % en GD, 55.4 % en CA1, y 49.7 % en CA3), comparado con el grupo “CN (Vehículo)”. Fueron observados varios grupos neuronales de morfología atípica que muestran diferentes grados de picnosis y retracción nuclear y/o somática, además de encontrarse un grado severo de edema intersticial (Fig. 41).

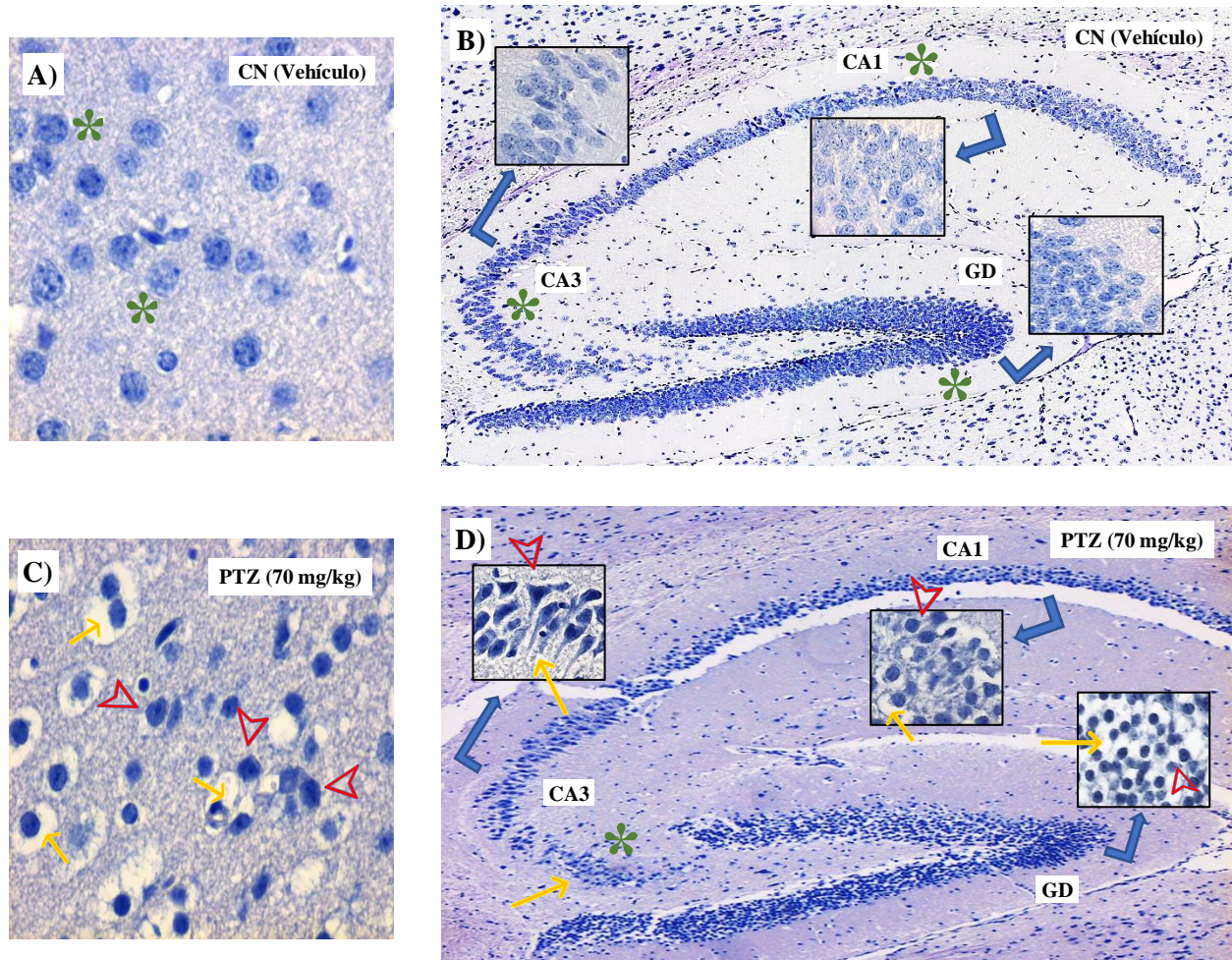


Figura 41. Efecto de la administración aguda de *PTZ*. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *PTZ* (70 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (C, 100X) e hipocampo (D, 40X) cerebral de ratón en comparación con el control (A, 100X; y B, 40X). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

Con respecto a la evaluación de los compuestos, las tres dosificaciones de escamonia 1 protegieron significativamente la integridad celular contra la inducción de daño con *PTZ*, mostrando un %CC de 69.4 %, 73.7 % y 65.9 % en corteza (Fig. 40-A).

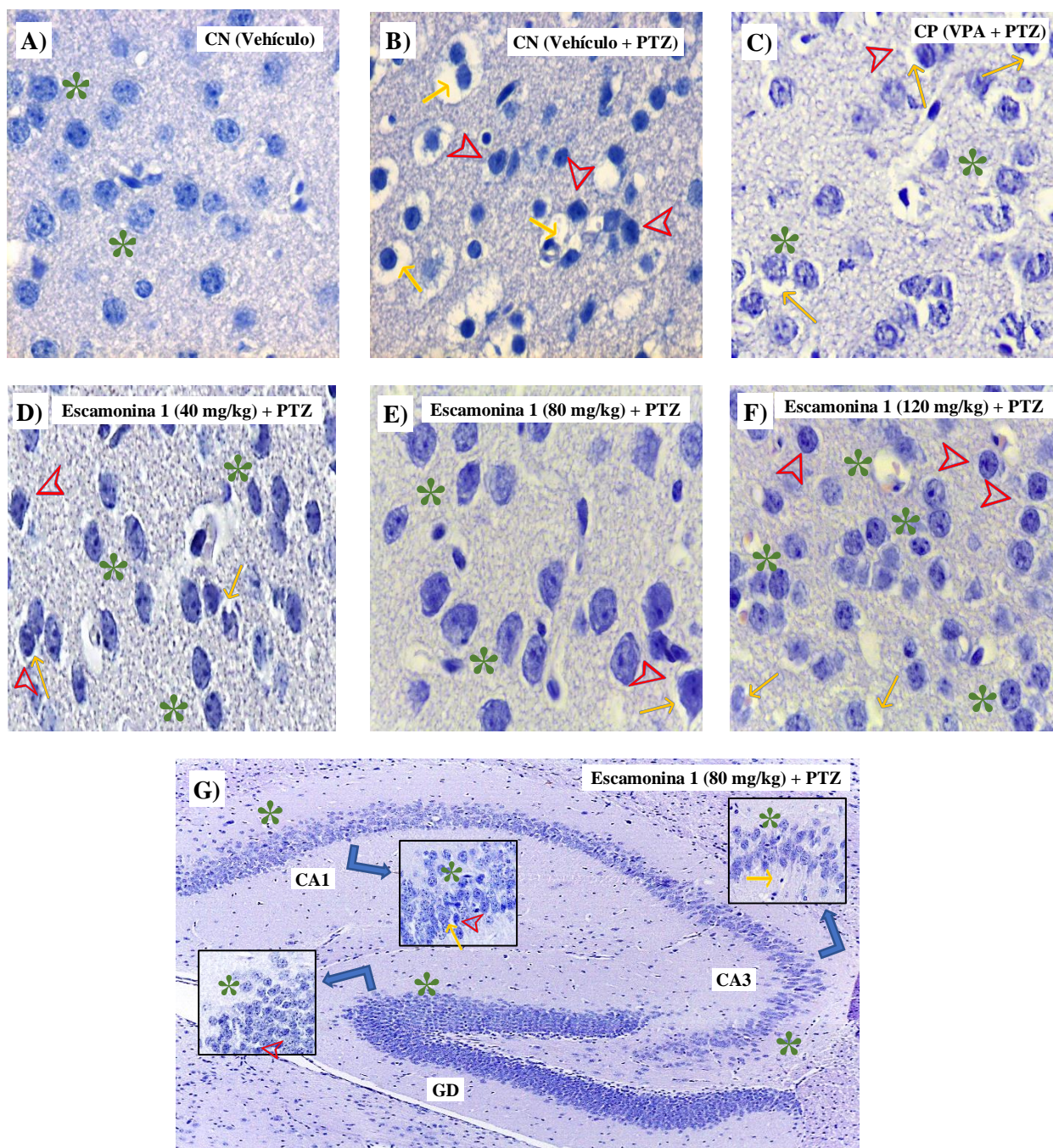


Figura 42. Efecto neuroprotector de la administración aguda de *escamoina 1*. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamoina 1* a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (D - F, 100X) e hipocampo (G, 40X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones control (A - C, 100X), en un modelo de convulsión con PTZ. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

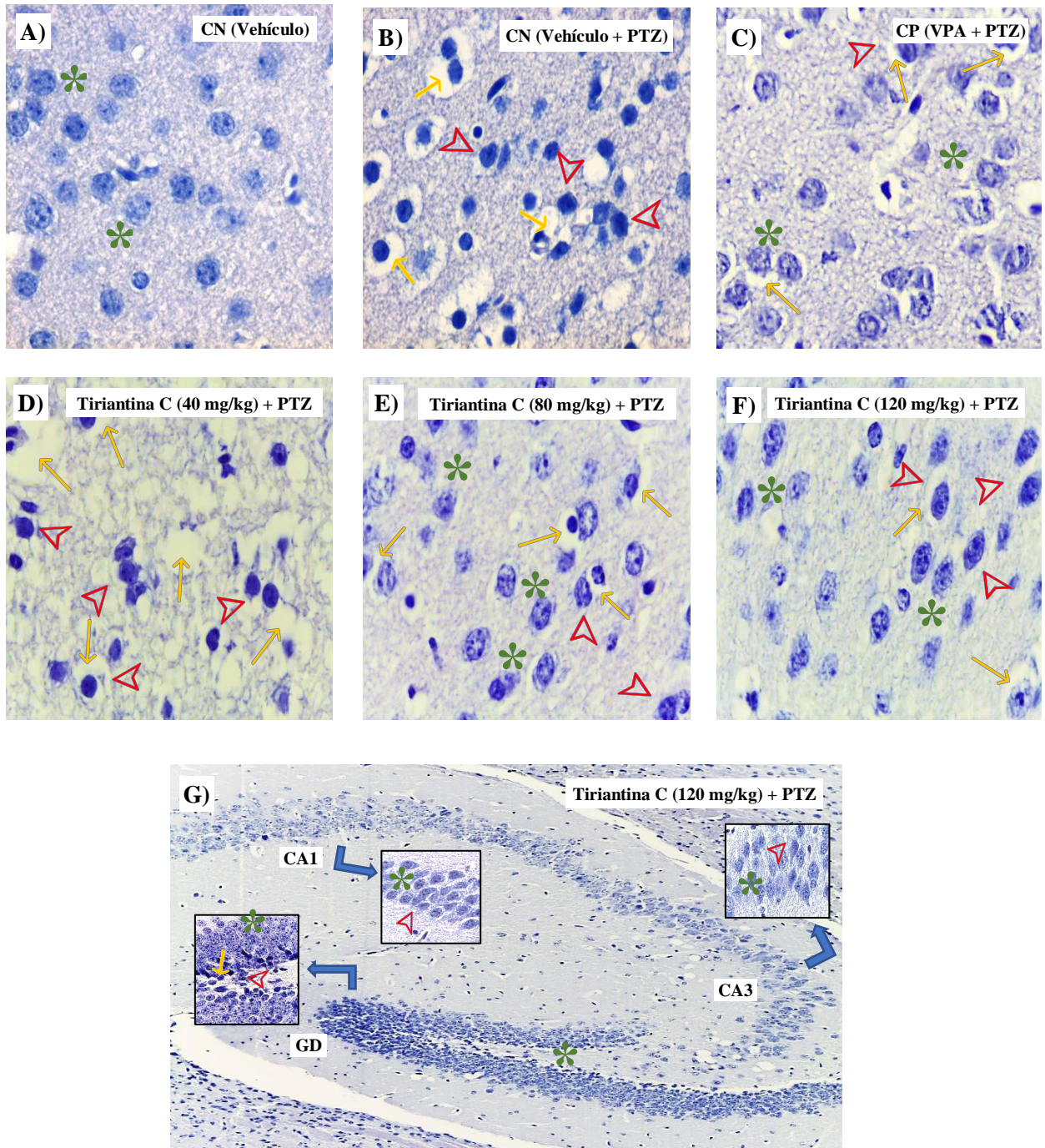


Figura 43. Efecto neuroprotector de la administración aguda de *tiriantina C*. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *tiriantina C* a diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (D - F, 100X) e hipocampo (G, 40X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones control (A - C, 100X), en un modelo de convulsión con PTZ. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

Sin embargo, solo dos dosificaciones de escamonia 1 (40 y 80 mg/kg) lograron proteger significativamente la integridad neuronal en el hipocampo (73.7 % y 84.7 % en GD, 67 % y 79.3 % en CA1, y 70.7 % y 88.7 % en CA3, respectivamente); las muestras correspondientes a la dosis de 120 mg/kg mostraron disminución significativa del %CC en hipocampo (9.3 % en GD, 16 % en CA1, y 32 % en CA3).

El efecto protector de las dosificaciones de escamonia 1 contra la inducción de daño con PTZ en corteza e hipocampo (Fig. 40: A y B) fue significativamente similar a los obtenidos con la administración del VPA (66.5 % en corteza, 83.3 % en GD, 85.5 % en CA1, y 78 % en CA3). En los grupos protegidos, la mayoría de las neuronas no mostraron alteraciones morfológicas, observándose pocas células picnóticas o con retracción somática; además de haber una disminución considerable del edema intersticial generado por PTZ (Fig. 42).

Para el caso de tiriantina C, solo dos dosificaciones (80 y 120 mg/kg) protegieron significativamente la integridad celular en corteza (70.7 % y 68.3 % de CC, respectivamente) e hipocampo (GD: 83.3 % y 88 %, CA1: 86 % y 83 %, y CA3: 87.7 % y 83 %, respectivamente) contra la inducción de daño con PTZ (Fig. 40-C y 40-D). Estos resultados fueron significativamente similares a los observados con la administración del VPA.

Las microfotografías del tratamiento con 40 mg/kg de tiriantina C muestran un %CC estadísticamente similar al del PTZ, encontrándose numerosas células picnóticas, con retracción núcleo-somática, pérdida de forma y marcado edema intersticial. En las dosificaciones de 80 y 120 mg/kg no se mostró muy alterada la morfología celular, por lo que solamente se observó poca retracción somática; sin embargo, se sigue observando un rango de bajo a moderado edema intersticial (Fig. 43).

B. Administración “subcrónica”

Después de la evaluación del efecto anticonvulsivo de la dosificación subcrónica de escamonia 1 y tiriantina C, fue realizado el análisis histoquímico correspondiente con el efecto neuroprotector contra la inducción de daño agudo y crónico con PTZ (70 y 40 mg/kg, respectivamente).

Inducción de daño agudo

La administración subcrónica con vehículo o glicolípido genero cambios significativos en el %CC en corteza e hipocampo con respecto a lo descrito en el modelo de administración aguda. La figura 44 muestra el %CC correspondiente a cada pretratamiento (vehículo, VPA o compuestos) en el modelo de daño agudo con PTZ.

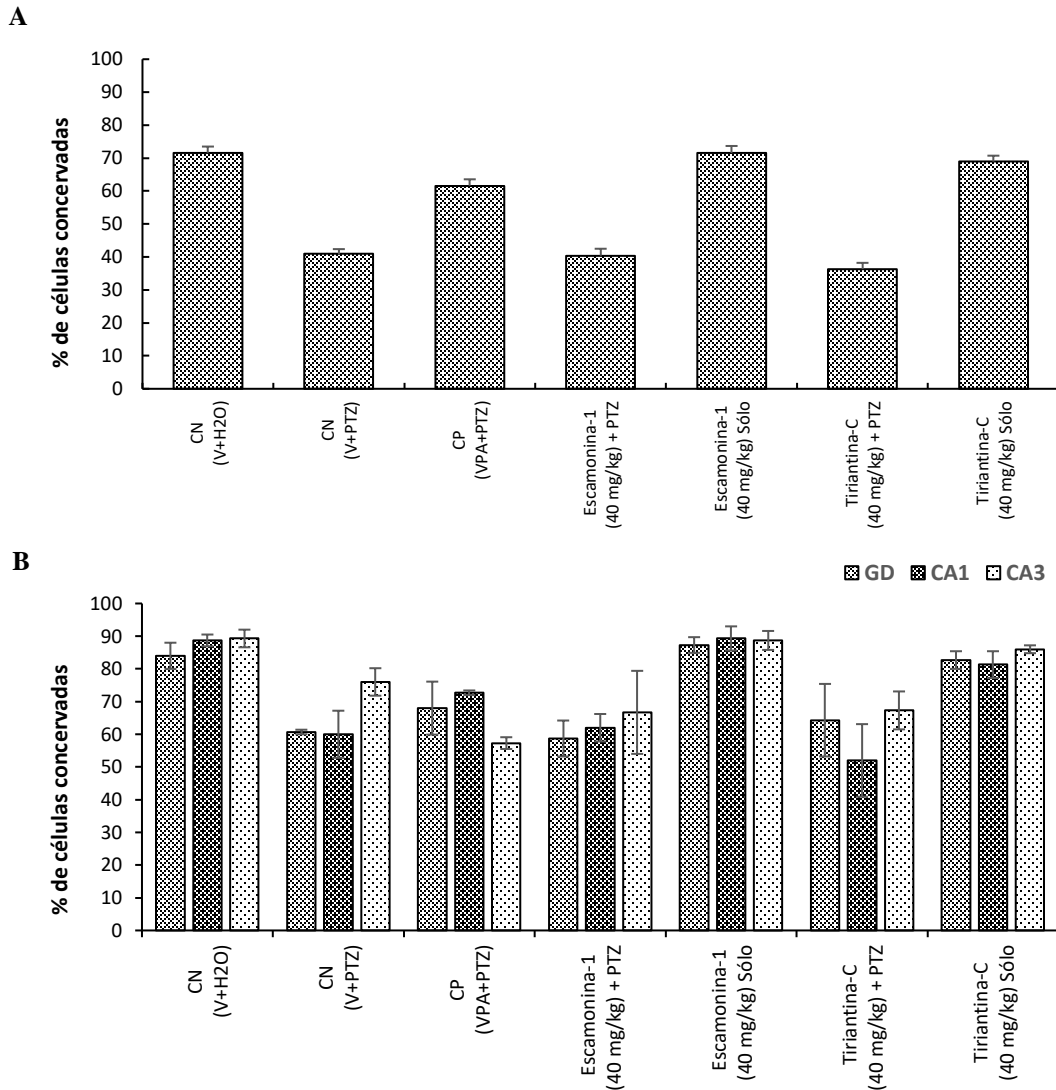


Figura 44. Efecto de la administración subcrónica de escamonia 1 y tiriantina C sobre la integridad celular frente a la inducción de daño con PTZ en cerebro de ratón. Se muestra el efecto que tiene el pretratamiento con escamonia 1 y tiriantina C (40 mg/kg) frente a la inducción de daño con PTZ (70 mg/kg). Los valores son los porcentajes de células conservadas promedio \pm SEM observadas en cortes histológicos de corteza cerebral de ratón teñidos con hematoxilina – eosina (30 campos observados), ANOVA y Bonferroni ($p < 0.05$).

En el grupo “CN (V + PTZ)” se observó una disminución del %CC (corteza: 40.9 %, GD: 60.7 %, CA1: 60 %, y CA3: 76 %), pero en menor grado en comparación con los resultados observados en el modelo de administración aguda en comparación con su respectivo grupo “CN (Vehículo)”. A nivel histológico, se pudo observar edema intersticial severo y algunos grupos neuronales de morfología atípica con retracción nucleosomática, nucléolo excéntrico y picnósis (Fig. 45-B).

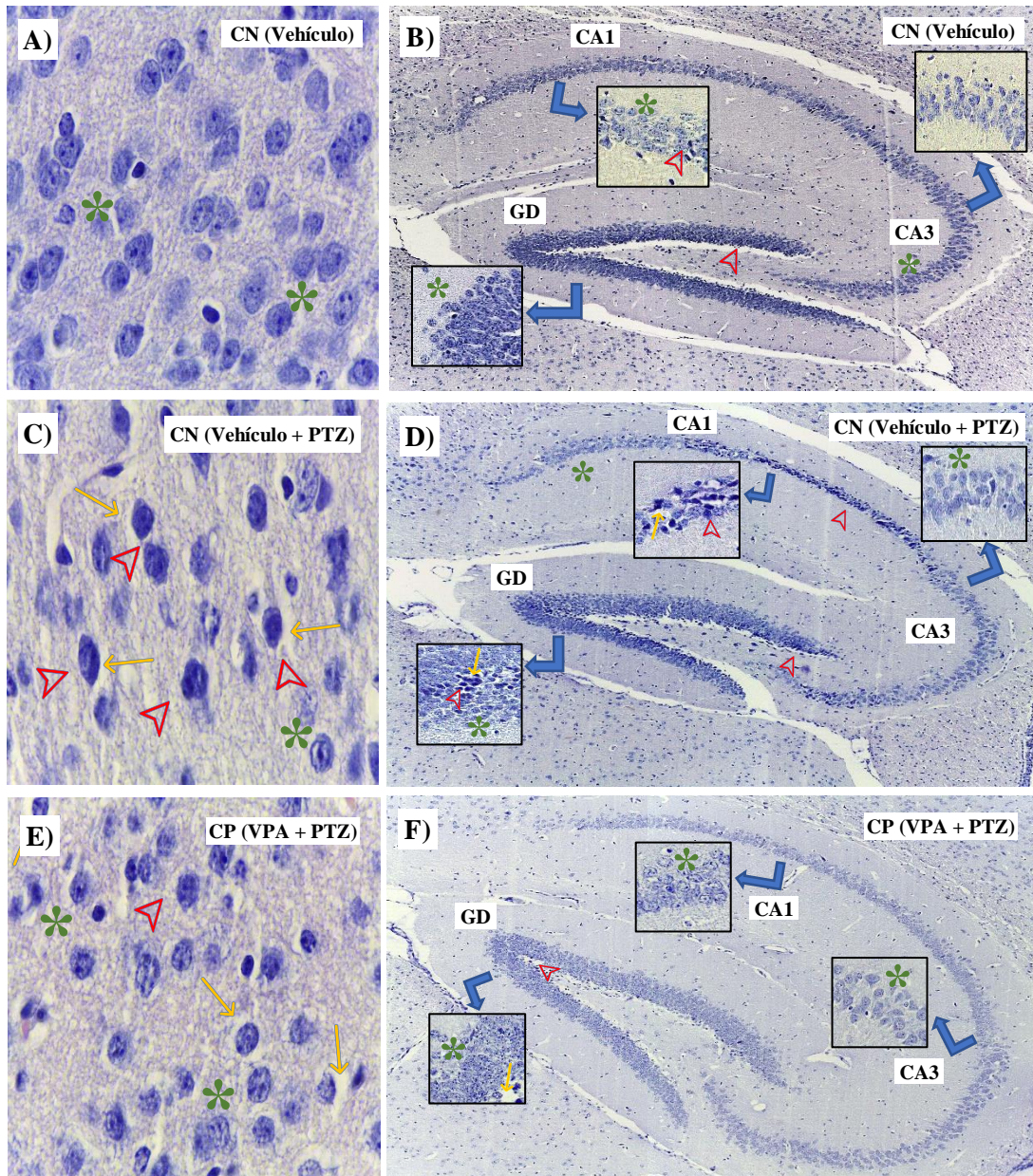


Figura 45. Histología de los grupos control del modelo de convulsión con PTZ. Las micrografías muestran las características histológicas que tiene la administración aguda de PTZ en ratones con pretratamiento subcrónico con Vehículo y VPA, observándose su efecto sobre la integridad neuronal en corteza (A, C y E, 100X) e hipocampo (B, D y F, 40X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones en ausencia de daño (A - C, 100X). Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, > = picnolisis.

La administración de VPA protegió significativamente contra el daño que genera PTZ sobre la integridad de la morfología celular en corteza (61.6 %), pero no en hipocampo (GD: 68 %, CA1: 72.7 %, y CA3: 57.3 %), observándose en su mayoría neuronas redondas típicas, pocas células picnóticas, retracción somática, y ligera disminución en el edema intersticial con respecto al producido con PTZ (Fig. 45-C).

El efecto de la administración subcrónica de escamonina 1 y tiriantina C no generó cambios significativos en el %CC en corteza (71.5 % y 68.9 %, respectivamente) e hipocampo (GD: 87.3 % y 82.7 %, CA1: 89.3 % y 81.3 %, y CA3: 88.7 % y 86 %, respectivamente) con respecto a lo observado en los grupos “CN (Vehículo)” y/o “CP (VPA + PTZ)”. Estos compuestos no generaron cambios histológicos significativos con respecto a la morfología neuronal (Fig. 46).

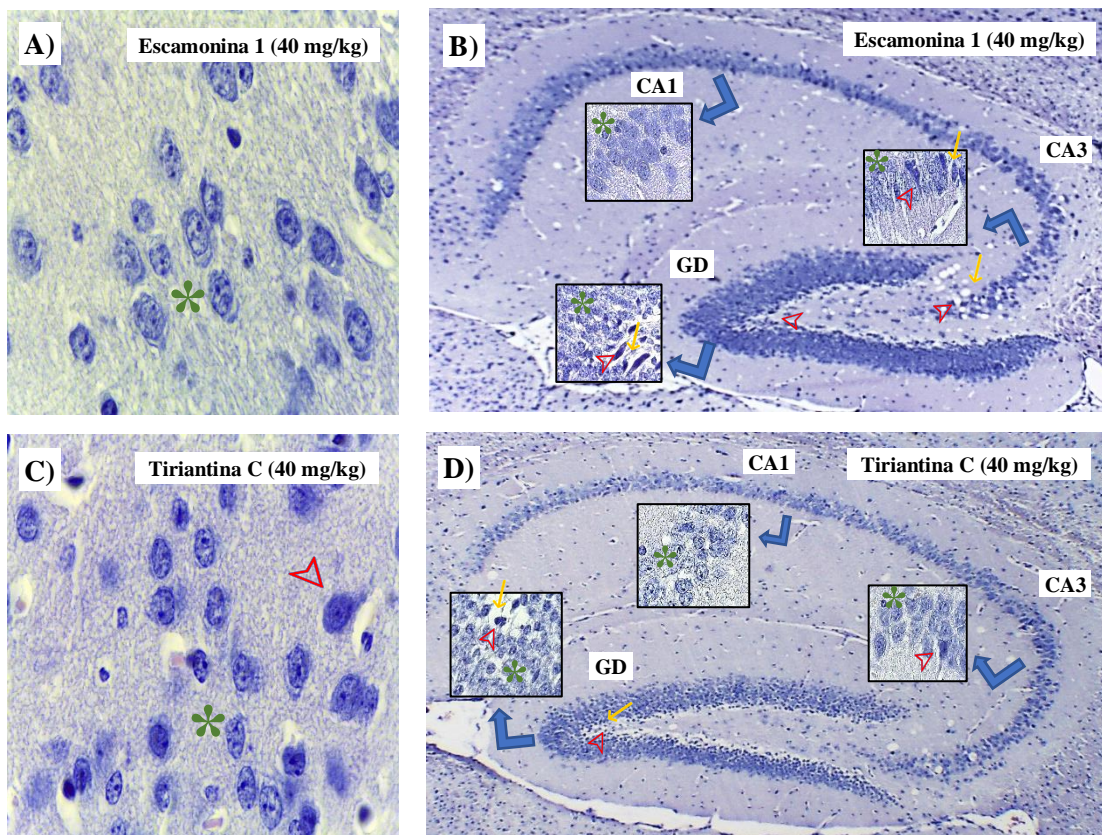


Figura 46. Efecto de la administración subcrónica de *escamonina 1* y *tiriantina C*. Se muestra el efecto que tiene el pretratamiento subcrónico con 40 mg/kg (vía i.p.) de *escamonina 1* (A y B) y *tyrianthina C* (C y D) sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (A y C, 100X) e hipocampo (B y D, 40X) cerebral de ratón; teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

Por otro lado, la administración subcrónica de estos compuestos no protege contra el daño generado por el PTZ en corteza e hipocampo, encontrándose %CC's estadísticamente parecidos al grupo "CN (Vehículo + PTZ)". Los %CC's generados por escamonina 1 y tiriantina C en corteza (40.4 % y 36.3 %, respectivamente) e hipocampo (GD: 58.7% y 64.3 %, CA1: 62 % y 52 %, y CA3: 66.7 % y 67.3 %, respectivamente) fueron estadísticamente similares entre ellos, observándose moderado edema intersticial) y células picnóticas con retracción somática (Fig. 47).

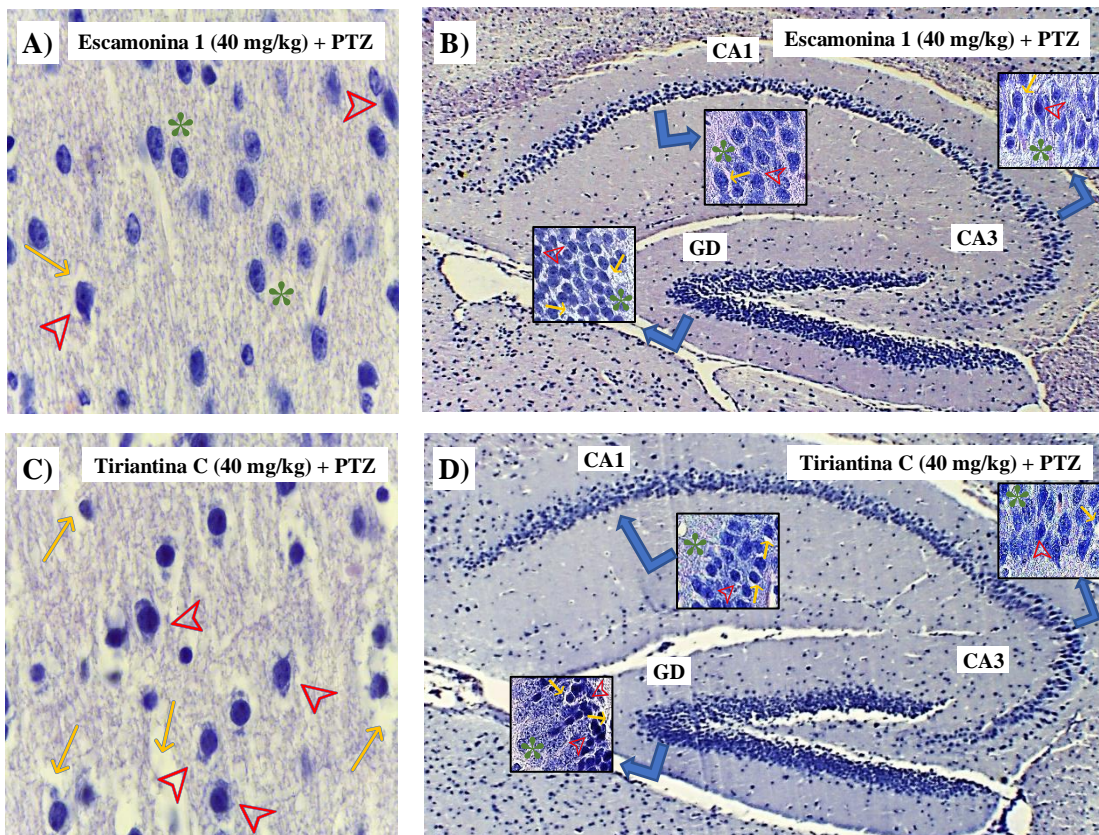


Figura 47. Efecto neuroprotector de la administración subcrónica de escamonina 1 y tiriantina C sobre la integridad celular frente a la inducción de daño con PTZ en cerebro de ratón. Se muestra el efecto que tiene el pretratamiento con 40 mg/kg de escamonina 1 (A y B) y tiriantina C (C y D) frente a la inducción de daño con PTZ (70 mg/kg). Las micrografías corresponden a cortes histológicos de corteza (A y C, 100X) e hipocampo (B y D, 40X) cerebral de ratón; teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▷ = picnosis.

Inducción de daño crónico

El modelo de daño crónico plantea la evaluación de la actividad protectora bajo condiciones similares a las que se podrían encontrar en epilepsia con respecto al deterioro histológico. La figura 48 muestra

el %CC correspondiente a cada tratamiento (vehículo, VPA o compuestos) en el modelo de daño crónico con PTZ a concentración subconvulsivante (40 mg/kg), pero solo evaluado en corteza cerebral.

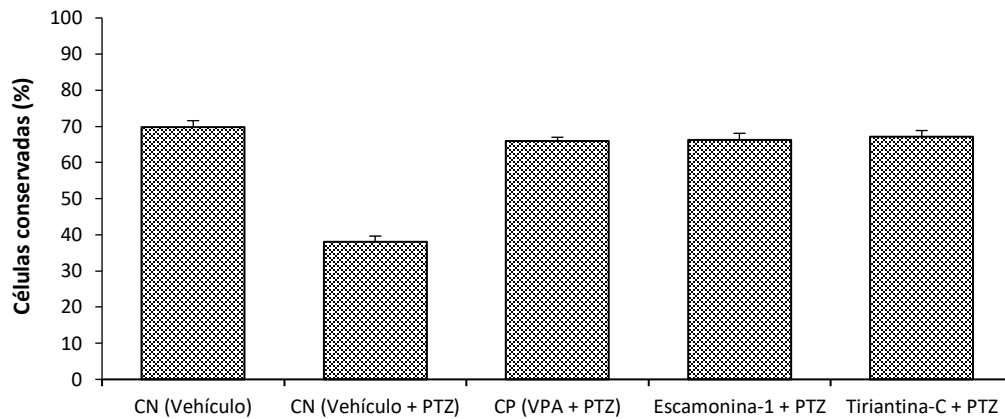


Figura 48. Efecto de la administración subcrónica de escamonia 1 y tiriantina C sobre la integridad celular en corteza cerebral de ratón frente a la inducción de daño crónico en un modelo con PTZ. Se muestra el efecto que tiene el pretratamiento con escamonia 1 y tiriantina C (40 mg/kg) frente a la inducción de daño en ratones sensibilizados con PTZ (40 mg/kg). Los valores son los porcentajes de células conservadas promedio \pm SEM observadas en cortes histológicos de corteza cerebral de ratón teñidos con hematoxilina – eosina (30 campos observados), ANOVA y Bonferroni ($p < 0.05$).

El grupo control sin inducción de daño mostró un 69.8 %CC, observadas como neuronas viables sin degeneración y con morfología típica (núcleo redondeado y nucléolo definido y céntrico), sin presencia de edema intersticial evidente y gliosis. En contraste, el grupo con inducción de daño crónico, que alcanzó un estado epiléptico sin protección, mostró una disminución significativa de la integridad neuronal (38.0 %CC) y observándose en su mayoría células picnóticas-amorfas con nucléolo excéntrico, presencia de células con retracción nucleosomática, y edema intersticial severo.

En el caso de los grupos administrados con VPA, escamonia 1 o tiriantina C, los %CC's fueron significativamente similares entre sí (65.9 %, 66.3 % y 67.1, respectivamente) y al mostrado en el grupo control sin inducción de daño. En las muestras histológicas no se encontraron cambios significativos con respecto a la morfología neuronal (células redondas típicas y algunas células picnóticas con poca o nula retracción somática), además de disminución evidente del edema intersticial (Fig. 49).

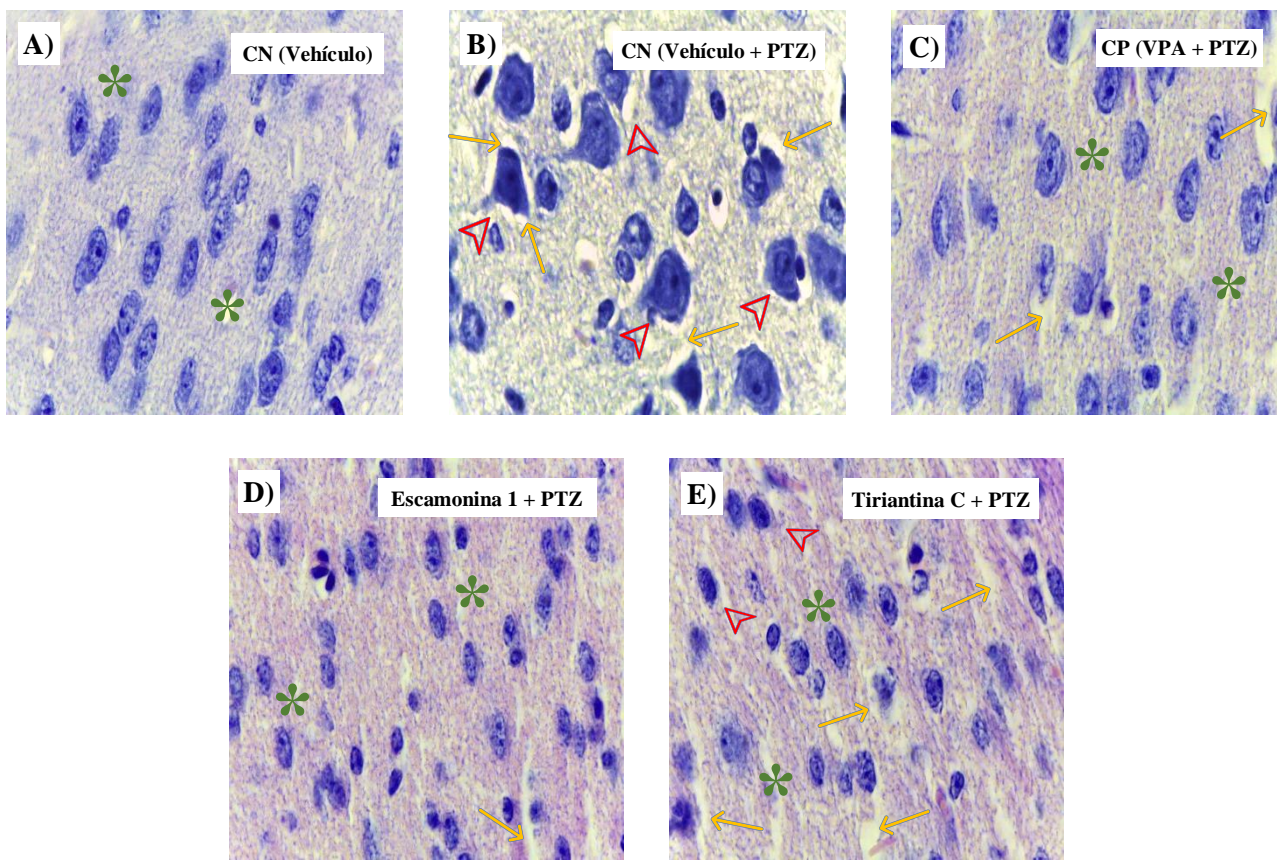


Figura 49. Efecto neuroprotector de la administración subcrónica de *escamoinina 1* y *tiriantina C* en un modelo de daño crónico con PTZ. Se muestra el efecto que tiene la administración subcrónica vía i.p. de *escamoinina 1* y *tiriantina C* a una concentración de 40 mg/kg sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (D y E, 100X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones control (A - C, 100X), en un modelo de convulsión con PTZ. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina – eosina. * = Morfología normal, → = edema, ▽ = picnosis.

4.4.1.3 Neurodegeneración, viabilidad neuronal y activación glial inducida por PTZ

Debido a que la técnica de H-E mostró diferentes efectos sobre la integridad de la morfología celular, las muestras histológicas se volvieron a analizar posteriormente con tres técnicas diferenciales: 1) tinción argéntica, 2) inmunotinción para GFAP e 3) inmunotinción para NeuN. La primera se basa en el principio de impregnación de plata con respecto al grado de daño celular o neurodegeneración. La segunda identifica la expresión de proteínas de los filamentos intermedios astrogliales como la proteína glial ácida fibrilar o GFAP, lo cual permite identificar el grado de activación en las células gliales (gliosis) en respuesta al daño celular y con efecto inflamatorio negativo. Y, por último, el

análisis de la presencia de expresión del antígeno nuclear neuronal o Neu-N como indicativo de la integridad y/o viabilidad neuronal, para correlacionarla con los cambios morfológicos celulares en respuesta al daño generado por PTZ.

A. Administración “aguda”

De acuerdo con la tinción argéntica, se observó menor grado de neurodegeneración en las células correspondientes a los tratamientos de la dosis de 80 mg/kg en ambos compuestos, además de haber fibras neuronales continuas y menos engrosadas con respecto a los controles. Esto indica que el pretratamiento con escamonina 1 y tiriantina C evito daño celular al proteger a las células del efecto del PTZ, y posiblemente manteniendo un alto porcentaje de células viables (Fig. 50).

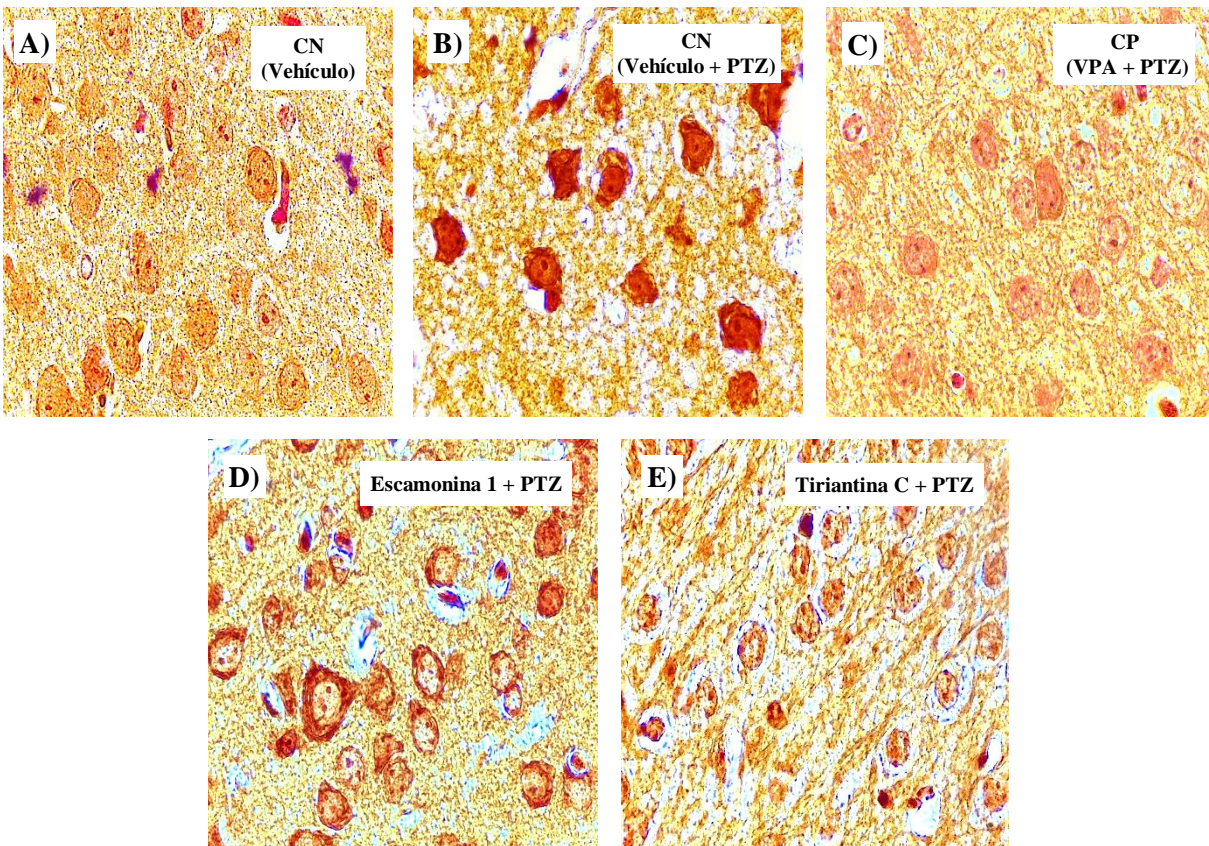


Figura 50. Efecto neuroprotector de la administración aguda de *escamonina 1* y *tiriantina C* contra la neurodegeneración. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamonina 1* y *tiriantina C* a una concentración de 80 mg/kg sobre la integridad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (D y E, 100X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones control (A - C, 100X), en un modelo de convulsión con PTZ. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica plata-amino-cúprica; a mayor intensidad de tinción mayor es el grado de neurodegeneración.

Con respecto al análisis inmunohistoquímico, los tratamientos con la dosis aguda de 80 mg / kg de escamonina 1 y tiriantina C mostraron la mayor cantidad de células que expresan el antígeno nuclear neuronal o Neu-N (Fig. 51), observándose una tonalidad más intensa en aquellas células protegidas (integridad y / o viabilidad neuronal) con respecto al grupo administrado con PTZ (ausencia de tinción).

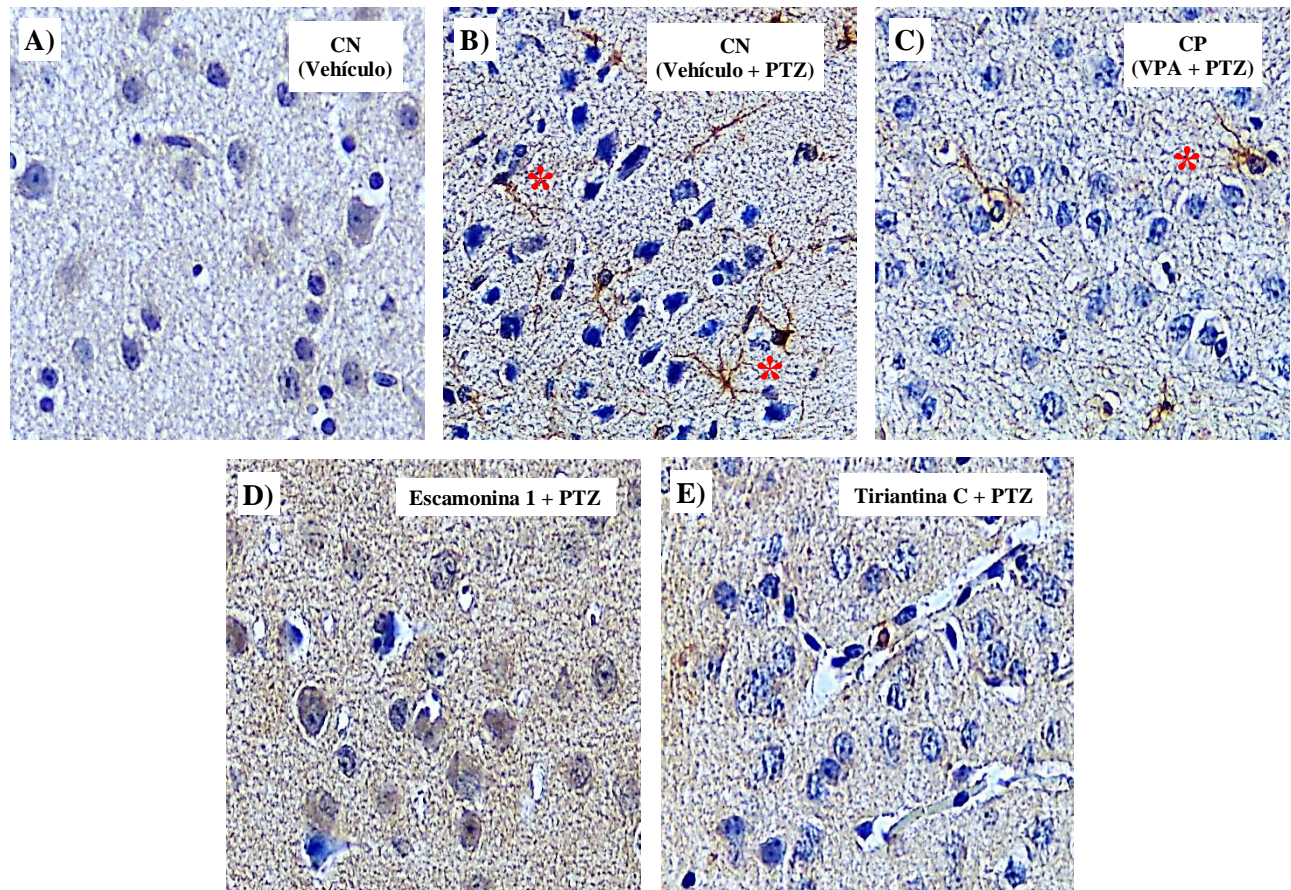


Figura 51. Efecto de la administración aguda de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la activación glial. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamonina 1* y *tiriantina C* a una concentración de 80 mg/kg sobre la activación glial (gliosis) observada en cortes histológicos de corteza (D y E, 100X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones control (A - C, 100X), en un modelo de convulsión con PTZ. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica inmunohistoquímica para GFAP. * = astrocito activado.

Por otro lado, los tratamientos con los glicolípidos a la concentración de 80 mg / kg generaron una disminución considerable en el número de células (astrocitos activados) que expresan proteína gliofibrilar ácida (GFAP), es decir, menos células gliales con engrosamiento dendrítico con respecto al grupo de daño con PTZ (Fig. 52).

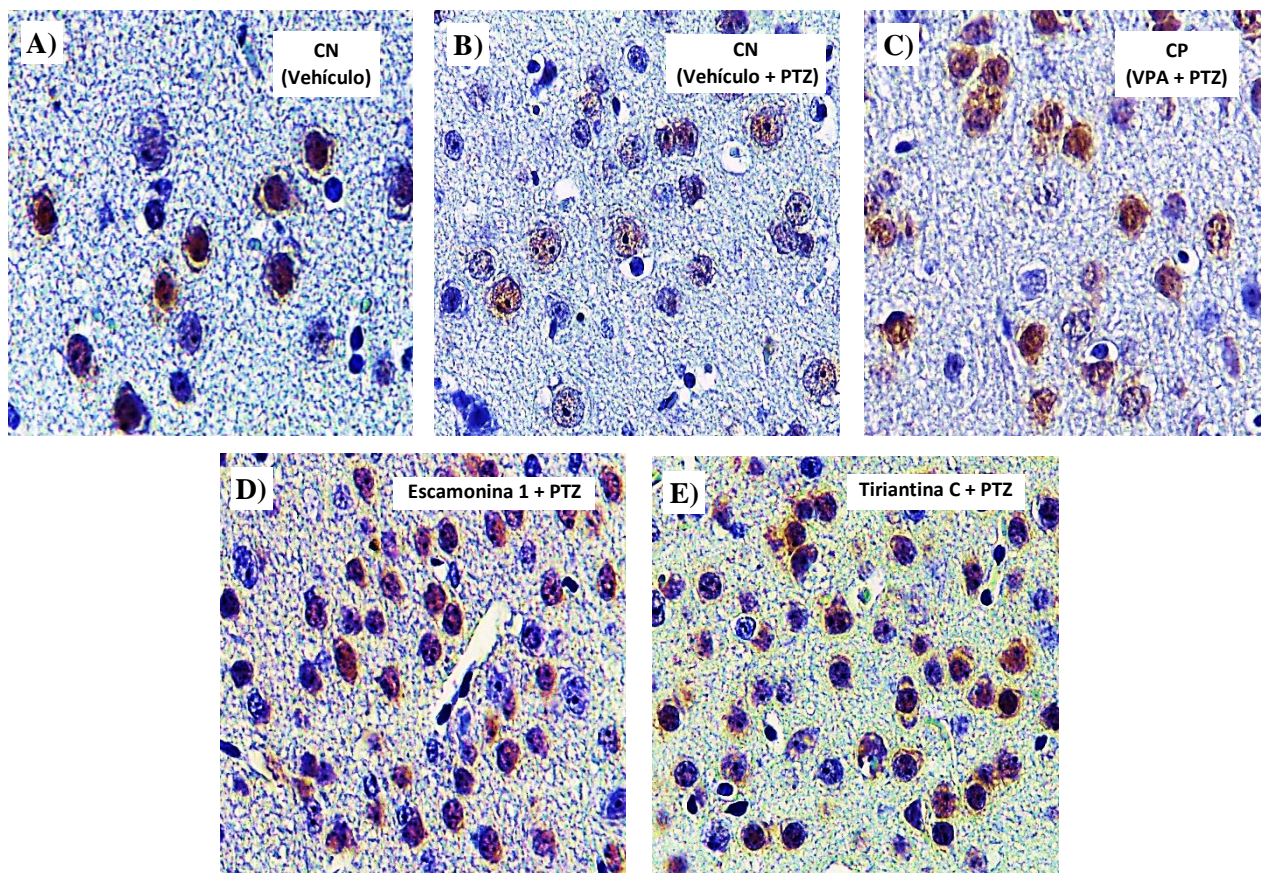


Figura 52. Efecto de la administración aguda de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la viabilidad neuronal. Se muestra el efecto que tiene la administración aguda vía i.p. de *escamonina 1* y *tiriantina C* a una concentración de 80 mg/kg sobre la viabilidad neuronal observada en cortes histológicos de corteza (D y E, 100X) cerebral de ratón en comparación con las condiciones control (A - C, 100X), en un modelo de convulsión con PTZ. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica inmunohistoquímica para Neu-N. La tinción marrón es indicativa de viabilidad.

B. Administración “subcrónica”

Con respecto al modelo de daño agudo con PTZ, el pretratamiento subcrónico con 40 mg / kg de *escamonina 1* y *tiriantina C* no disminuyó el grado de neurodegeneración celular. Sin embargo, éstos generaron una ligera disminución de la expresión de GFAP y aumentó el número de neuronas que expresan Neu-N en comparación con el grupo de daño; observándose algunas células gliales reactivas con engrosamiento dendrítico y aumento de las células con mancha marrón intenso en la corteza y el hipocampo (Fig. 53). Por otro lado, en el modelo de daño crónico con PTZ, el pretratamiento de ratones con la misma dosis de *escamonina 1* y *tiriantina C* mantuvo la viabilidad celular y disminuyó la neurodegeneración y gliosis (activación astrocítica) en la corteza y el hipocampo; similar a lo observado en el grupo dosificado con VPA (Fig. 54).

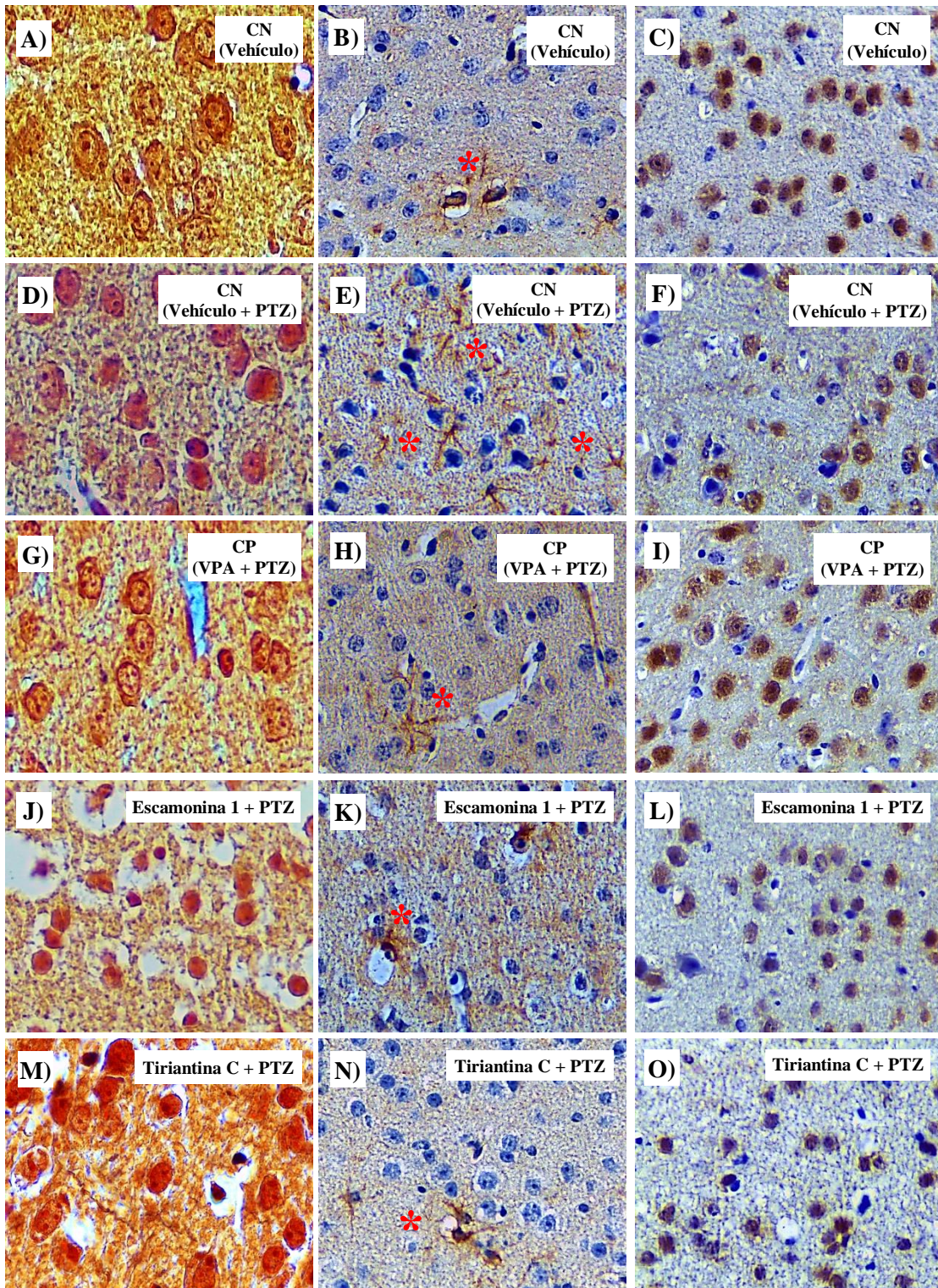


Figura 53. Efecto de la administración subcrónica de *escamoinina 1* y *tiriantina C* sobre la activación glial, viabilidad y degeneración neuronal. Se muestra el efecto que tiene la administración subcrónica vía i.p. de *escamoinina 1* y *tiriantina C* a una concentración de 40 mg/kg en comparación con las condiciones control, sobre la activación glial (B, E, H, K y N, 100X), viabilidad (C, F, I, L y O, 100X) y degeneración neuronal (A, D, G, J y M, 100X). Las muestras corresponden a la corteza cerebral de ratones usados en un modelo de daño agudo. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica de plata-amino-cúprica y la técnica inmunohistoquímica para GFAP y Neu-N. La tinción marrón es indicativa de viabilidad. * = astrocito activado.

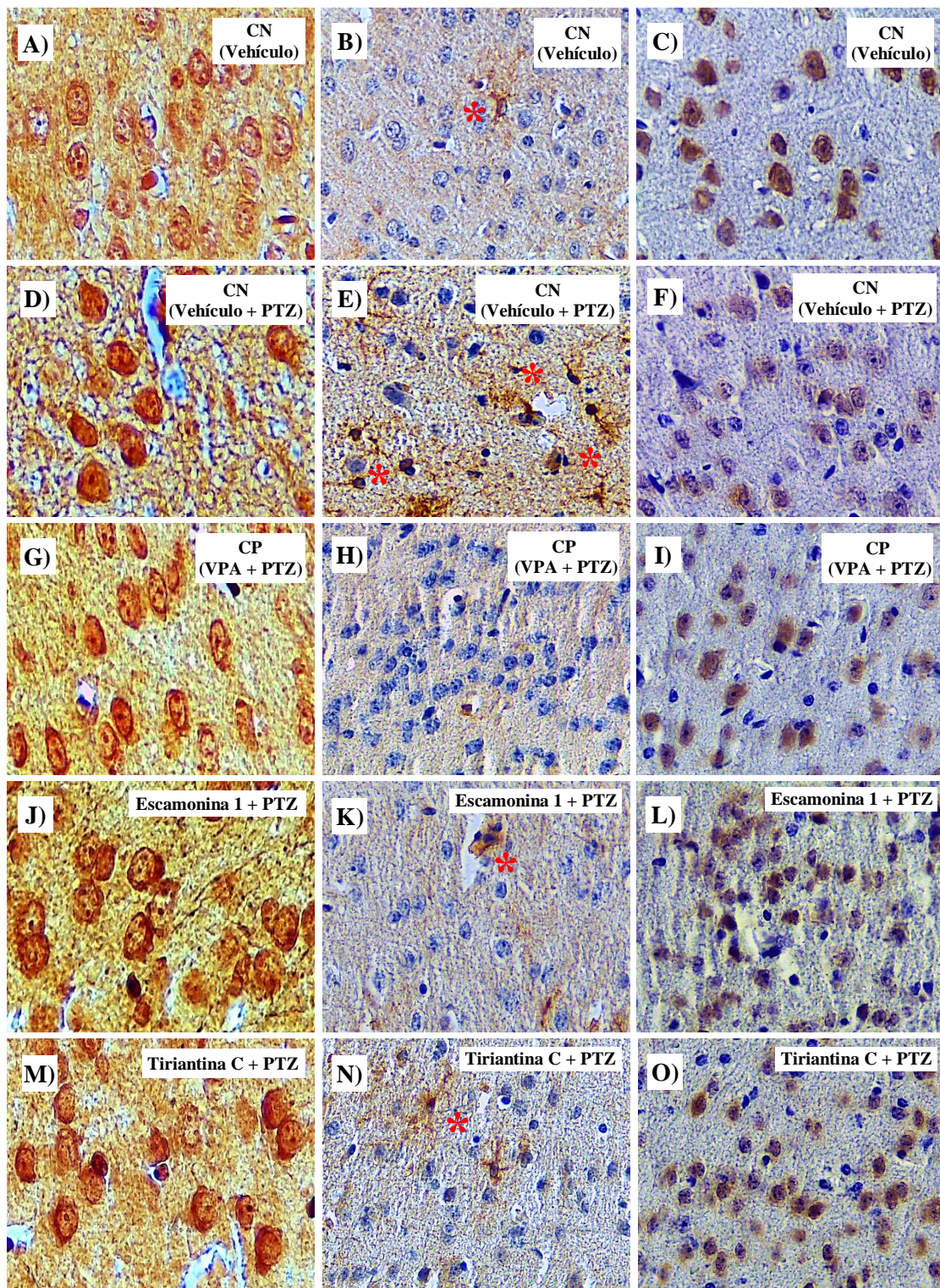


Figura 54. Efecto de la administración subcrónica de *escamoina 1* y *tiriantina C* sobre la activación glial, viabilidad y degeneración neuronal. Se muestra el efecto que tiene la administración subcrónica vía i.p. de *escamoina 1* y *tiriantina C* a una concentración de 40 mg/kg en comparación con las condiciones control, sobre la activación glial (B, E, H, K y N, 100X), viabilidad (C, F, I, L y O, 100X) y degeneración neuronal (A, D, G, J y M, 100X). Las muestras corresponden a la corteza cerebral de ratones usados en un modelo de daño crónico. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica de plata-amino-cúprica y la técnica inmunohistoquímica para GFAP y Neu-N. La tinción marrón es indicativa de viabilidad. * = astrocito activado.

4.5 Discusión

La neuroprotección es un proceso intrínseco o extrínseco en el cual un compuesto sintético o biológico evita que se lleven a cabo la degeneración y /o muerte celular. Este tipo de moléculas o protectores suelen intervenir en los procesos inflamatorios, de estrés oxidativo o de excitotoxicidad en SNC, para evitar el daño progresivo y mantener la integridad tisular. Por lo que la evaluación del efecto neuroprotector comprende el estudio de la actividad anticonvulsiva, antiinflamatoria, antioxidante, y el análisis histoquímico.

Generalmente, la estrategia inicial para determinar la propiedad neuroprotectora de algunos productos naturales (extractos herbales y /o metabolitos puros) es a través de la evaluación de las actividades que la comprenden bajo diferentes esquemas de administración y en modelos que emulen las circunstancias patológicas. Sin embargo, en el caso particular de aquellos compuestos que muestran actividad anticonvulsiva (dosis agudas), se ha asumido de forma errónea que la inhibición de la convulsión es sinónimo de neuroprotección.

Para el caso de los glicolípidos aislados de *Ipomoea*, principalmente de aquellos con reportes etnomédicos relacionados con SNC, se ha visto que muchos de ellos cumplen con la actividad anticonvulsiva. Sin embargo, la mayoría han sido evaluados con administraciones agudas de los extractos o metabolitos evaluados, lo que limita el rango de información que se podría obtener sobre su farmacología. Es por ello, que el uso de modelos de administración prolongada (p. ej., subcrónica y crónica) pueden ayudar a establecer el efecto positivo o negativo de un fármaco con respecto al tiempo de su dosificación, y determinar su posible efectividad en modelos de daño crónico.

En este sentido, se encontró que el efecto de su administración aguda (aumento de latencia, disminución del # de convulsiones y severidad) de escamonina 1 y tiriantina C resultó ser dosis-dependiente en un modelo murino de convulsión. Posiblemente por el efecto que tienen estos compuestos sobre la sinapsis GABAérgica, en donde aparentemente incrementa la actividad inhibitoria al evocar la liberación de GABA o evita su eliminación (actividad *in vitro*). Sin embargo, el efecto anticonvulsivo que tienen ambos compuestos también puede involucrar otros mecanismos de acción.

PTZ (pentilenetetrazol) es un antagonista no competitivo para el receptor GABA_A usado como agente convulsivo desde 1926 (Ramos-Morales, 2012). El modelo PTZ en convulsiones se emplea en la evaluación de la actividad anticonvulsiva de nuevas moléculas que pueden tener un efecto antagonista sobre PTZ o sobre el receptor GABA_A (Ramos-Morales, 2012), además de los mecanismos relacionados con el incremento de la concentración de GABA. Muchos fármacos afectan las funciones de los receptores GABA_A como agonista (por ejemplo, muscimol), antagonista (por ejemplo, bicuculina y picrotoxina) o modulador (por ejemplo, benzodiazepinas y barbitúricos); y varios metabolitos naturales que poseen actividad anticonvulsiva podrían actuar sobre los receptores GABA_A (Mehta, 1999; Kumar y Khanum, 2012).

Resulta interesante que muy pocos compuestos poseen diferentes posibles blancos farmacológicos y que éstos a su vez tengan un efecto común (potenciar la actividad inhibitoria GABAérgica intrínseca). Para el caso de la actividad anticonvulsiva de scammonin 1 y tyrianthin C en el modelo de convulsiones PTZ, nos pudiera sugerir que también pueden interactuar con el receptor GABA_A o tener un efecto antagonista a PTZ, además de su efecto sobre la concentración de GABA en la hendidura sináptica.

Hay que tener en claro que el tratamiento agudo, tanto en los modelos de convulsión y en la clínica, se usa para controlar las crisis convulsivas provocadas por intoxicación, infección, isquemia o trauma cerebral. Sin embargo, el tratamiento de enfermedades crónicas podría generar efectos secundarios (por ejemplo, hepatotoxicidad, hipersensibilidad o tolerancia) como sucede en el tratamiento de la epilepsia con algunos fármacos anticonvulsivos (por ejemplo, valproato, benzodiazepinas). Por lo tanto, algunos estudios también evalúan el efecto de la administración subcrónica y crónica de nuevos fármacos anticonvulsivos en diferentes modelos de daño (por ejemplo, daño agudo de PTZ, inflamación de PTZ).

En este sentido, el pretratamiento subcrónico de escamonina 1 y tiriantina C (40 mg/kg, diaria, por 8 días, vía i. p.), muestra una diferencia marcada con respecto al efecto anticonvulsivante que tienen, principalmente sobre el número de convulsiones inducidas por el PTZ (70 mg/kg, única, vía i. p.); en el que, aparentemente, solo la administración subcrónica de tiriantina C tuvo un efecto acumulativo similar a la de la dosis aguda a 80 mg/kg. Efectos similares se observaron en el caso de la

administración subcrónica de estos compuestos (40 mg/kg) en un modelo de daño crónico con PTZ (40 mg/kg), inhibiendo la aparición de convulsiones y previniendo la progresión del estado epiléptico.

El efecto subcrónico de estos glicolípidos posiblemente se deba a su naturaleza y complejidad química, en donde escamonina 1 (de estructura monomérica) es posiblemente metabolizada más rápido (evitando que alcance la concentración terapéutica) y tiriantina C (de estructura dimérica) tal vez se bioacumule después de varias dosis para alcanzar su efecto anticonvulsivo.

4.5.2 Actividad neuroprotectora

De acuerdo con algunos trabajos, la actividad anticonvulsiva de ciertas drogas puede ser generalizada o solo afectar regiones específicas (por ejemplo, corteza, hipocampo, cerebelo, sustancia negra, etc.) en SNC al potenciar la actividad inhibidora intrínseca, principalmente la ruta GABAérgica en modelos *in vitro*; sin embargo, esto no evita el progreso de la neurodegeneración en los modelos *in vivo* de convulsión. Esto indica que no solo la evaluación de la actividad anticonvulsiva determina si un fármaco es o no un neuroprotector y, por lo tanto, es necesario el análisis de estas actividades de forma directa (modelos específicos) o indirecta (hallazgos histológicos), para evaluar el grado de degeneración y viabilidad celular, así como la proliferación y / o reactividad de otros grupos celulares (por ejemplo, microglia y astrocitos).

Generalmente, en los modelos de convulsión se ven afectadas regiones cerebrales específicas, como la corteza (CTX), el hipocampo (Hp) y la amígdala; y que, en el modelo de convulsión con PTZ, se observó que afecta principalmente a subcampos del hipocampo (p. Ej., CA1, CA3 y DG) y Ctx (Ref), donde se genera el núcleo epileptogénico y su propagación respectivamente. Estos eventos convulsivos generan excitotoxicidad seguida de daño neuronal (picnosis, retracción citoplásmica y vacuolación y atrofia) y activación astrocítica, aumento en la liberación de mediadores proinflamatorios y de especies reactivas del oxígeno (ROS) implicados en los procesos de neurodegeneración. En este sentido, los fármacos neuroprotectores podrían contrarrestar este proceso neuroinflamatorio, excitotóxico y de estrés oxidativo; sin embargo, no todos estos medicamentos poseen estas características.

De acuerdo con la literatura y a los resultados obtenidos, VPA posee efecto anticonvulsivo y evitó el daño y muerte celular derivado de la excitotoxicidad, principalmente en el hipocampo; pero sin disminuir la presencia de edema intersticial. Esto sugiere que el VPA podría tener un efecto protector parcial, en donde se evita el efecto excitotóxico provocado por la inducción de crisis convulsivas con PTZ, pero sin mostrar una aparente actividad antiinflamatoria y / o antioxidante.

Actualmente ha surgido la necesidad de buscar nuevos fármacos que puedan brindar una amplia protección contra la progresión de los procesos neurodegenerativos; por lo que, el uso de plantas medicinales pudiera representar una nueva alternativa como fuente rica de compuestos con propiedades neuroprotectoras, tales como algunos glucolípidos aislados de extractos de la raíz de *Ipomoea tyrianthina*.

La administración aguda de escamonina 1 y tiriantina tuvo un efecto positivo con respecto al daño generado por PTZ, donde solo la actividad de tiriantina C fue dosis-dependiente. La disminución de gliosis y de la severidad del edema intersticial en corteza e hipocampo sugiere que posiblemente estos glicolípidos pudieran intervenir sobre alguna vía ligada con el proceso de inflamatorio, lo cual ayudaría a disminuir la actividad excitotóxica y explicaría el bajo grado de neurodegeneración y conservación de la viabilidad celular.

Por parte, el efecto de ambos glucolípidos a la dosis subcrónica de 40mg/kg fue similar al de la dosis aguda de 80mg/kg contra daño agudo con PTZ, observándose moderada degeneración neuronal y disminución del edema intersticial y gliosis. Estos datos podrían sugerir que escamonina 1 y tiriantina C presentan efecto aditivo, el cual está relacionado aparentemente con su complejidad estructural y su vida media diferencial (p. ej.; estabilidad, bioacumulación y eliminación metabólica) en el organismo.

En este sentido, la dosis subcrónica de los compuestos evitó la progresión del daño generado la administración crónica de PTZ, disminuyendo el grado de neurodegeneración y los hallazgos de neuroinflamación en el hipocampo y la corteza, sin generar daño celular aparente en otros tejidos como el hígado y el riñón. Estos resultados indican la posibilidad de que este tipo de metabolitos permitan la recuperación de la morfología típica de las neuronas y su función normal, evitando la

total degeneración y muerte celular propios de las enfermedades crónicas como la epilepsia, y sin mostrar efecto nocivo hepático o renal tal como se ha descrito para varios fármacos anticonvulsivos. Por lo que es necesario seguir estudiando más a detalle la farmacocinética y farmacodinamia en ambos casos para este tipo de metabolitos.

4.6 Conclusiones

- *Escamonina 1* y *tiriantina C*, administrados a dosis agudas, tienen efecto anticonvulsivo dosis-dependiente.
- La administración aguda de altas concentraciones de *escamonina 1* y *tiriantina C* (120 mg/kg) inhibe la actividad nerviosa, produciendo la muerte.
- La dosis de 80 mg/kg de *escamonina 1* y *tiriantina C* tuvo mejor efecto neuroprotector y sin producir muerte en el esquema agudo.
- *Escamonina 1* y *tiriantina C*, administrados a dosis subcrónica bajas (40 mg/kg), protegen y permiten la recuperación celular cortical ante el daño producido por la inducción a la convulsión con PTZ en un modelo de daño crónico (kindling).
- El efecto protector de *tiriantina C* administrado a dosis subcrónica posiblemente se deba a su bioacumulación o lenta eliminación por el organismo.
- *Escamonina 1* y *tiriantina C* previnieron las alteraciones morfológicas celulares generadas por PTZ (aumento del %CC).
- *Escamonina 1* y *tiriantina C* mostraron aparente actividad antiinflamatoria de acuerdo con los hallazgos histológicos en corteza cerebral.
- *Escamonina 1* y *tiriantina C* disminuyen la neurodegeneración y mantienen la viabilidad neuronal cortical.
- El efecto que tienen *escamonina 1* y *tiriantina C* en el modelo de convulsión con PTZ sugiere un posible mecanismo vía receptor GABAA.

Capítulo 5 : Discusión, conclusión y perspectivas finales

La mayoría de los metabolitos secundarios que poseen actividades neurofarmacológicas han mostrado la capacidad de modificar la excitabilidad neuronal en diferentes niveles. Algunos de los procesos afectados son la integridad de la membrana celular, los procesos de excitación o inhibición o la alteración de la función de algunas proteínas (transportadores, receptores y / o canales iónicos).

Los resultados de la evaluación *in vitro* indican que los glicolípidos podrían afectar las terminaciones nerviosas al mejorar la liberación basal de GABA endógeno; este hallazgo también se encontró con convolvulina aislada de la raíz de *Ipomoea tyrianthina* en donde, al igual que por otros glicolípidos [8], se observó un efecto dosis-dependiente diferencial sobre las concentraciones de GABA y ácido glutámico. En este sentido, el aumento de la concentración de GABA extracelular puede ocurrir por varios mecanismos: a) después de la despolarización de la membrana (entrada de Na^+ a través de canales de sodio), las terminaciones nerviosas pueden liberar GABA de las vesículas sinápticas mediante la exocitosis clásica dependiente de Ca^{2+} ; b) mediante el transporte inverso del transportador membranar GABA GAT-1, un proceso dependiente de Ca^{2+} , que trabaja en la dirección de adentro hacia afuera; c) facilitación de la reversión de los intercambiadores $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ de membrana por un aumento en el Na^+ citosólico, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y la consiguiente liberación del transmisor; d) el bloqueo del transportador membranar de GABA (GAT-1) aumentaría la concentración del GABA extracelular; y finalmente, e) el GABA sináptico liberado también puede activar los autoreceptores GABA_B presinápticos, lo que resulta en una reducción de GABA liberado, mientras que los bloqueadores del receptor GABA_B pueden aumentar el GABA extracelular. Con respecto a los procesos antes mencionados, el efecto de los glicolípidos sobre los cambios de concentración de calcio intracelular en el SNC no está claro. Sin embargo, se observó que escamonina 1 y tiriantina C provocan un aumento *in vitro* de la concentración de calcio intracelular en ensayos con espermatozoides humanos (comunicación personal), lo que indicaría que este aumento se debe a una probable activación de los canales de calcio o segundos mensajeros.

Por su parte, los resultados mostrados por escamonina 1 y tiriantina C en los ensayos *in vivo*, tanto en administración aguda como subcrónica, resultan muy similares a los reportados para VPA. Cabe mencionar que este fármaco es utilizado de forma rutinaria en el tratamiento de la epilepsia y que,

tanto su actividad anticonvulsiva y neuroprotectora, muy probablemente se deban por su efecto sobre la concentración de GABA. Sin embargo, lo que pudimos observar con respecto a los hallazgos histológicos, es que no previene o disminuye completamente la actividad inflamatoria reflejada por la presencia de edema intersticial y la activación astrocítica. Por lo que es importante destacar que escamonina 1 y tiriantina C, además de tener efecto sobre la actividad GABAérgica, son compuestos que tienen aparentemente actividad antiinflamatoria, que previenen la degeneración y mantienen la viabilidad celular.

Tomando en cuenta todos los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, probablemente la propiedad neuroprotectora de escamonina 1 y tiriantina C podría tener diferentes mecanismos de acción relacionados entre sí, tales como: 1) Protección contra la excitotoxicidad, en la que evocan un aumento en la concentración de GABA endógeno liberado en la hendidura sináptica y se genere un efecto compensatorio con respecto a la actividad excitadora excesiva; 2) potenciación de la actividad inhibitoria postsináptica relacionada con el efecto de estos compuestos sobre los receptores GABA_A y la disminución de la actividad sináptica excitadora en SNC; 3) modulación de los procesos dependientes del calcio, afectando la liberación de neurotransmisores y la activación glial; 4) modulación de la actividad inflamatoria y antioxidante, generando una disminución de edema intersticial y gliosis.

Se ha demostrado que extractos y compuestos puros de varias plantas actúan sobre los mismos blancos farmacológicos. Sin embargo, los hallazgos mencionados sugieren que escamonina 1 y tiriantina C tienen diferentes sitios diana, y que esta variación esté probablemente relacionada con su estructura química. Por lo tanto, la variabilidad en la estructura química puede ser un aspecto importante para comprender la actividad de estos metabolitos secundarios.

Escamonina 1 y tiriantina C son moléculas anfipáticas de alto peso molecular en relación con otros compuestos bioactivos, lo cuales poseen secciones estructurales hidrofóbicas (aglicona de ácido graso) e hidrofílicas (núcleo de glucona o sacárido), que podrían estar formando parte de un anillo macrocíclico (macrolactona) y presentar esterificaciones (ácidos grasos de cadena corta) en su aglicona.

Algunos autores proponen que la estructura macrocíclica se ha asociado con su actividad biológica, como es el caso de los efectos antimicrobianos y citotóxicos. Sin embargo, estudios recientes muestran que glicolípidos de diferente complejidad estructural (p. ej.; tiriantina A, ácido tiriantínico VI, escamonina 1 y tiriantina C) evocan la liberación de GABA en SNC de forma similar; sugiriendo que la actividad biológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, se da probablemente a través de diferentes mecanismos de acción en los que podrían estar implicados diferentes motivos estructurales.

Comparando las estructuras de glicolípidos como tiriantina A y ácido tiriantínico VI con la de escamonina 1 y tiriantina C, podemos observar que su núcleo oligosacárido se encuentra formado por las mismas secuencias de monosacáridos (quinovose-glucosa-ramnosa-quinosa), pero el tipo de ácido carboxílicos de cadena corta que los esterifican (ácidos tiglic, nilic y 2-metilbutanoico) son variables. Estos ácidos carboxílicos se han asociado con diversas actividades farmacológicas, como antiinflamatorias, antimicrobianas y/o antitumorales.

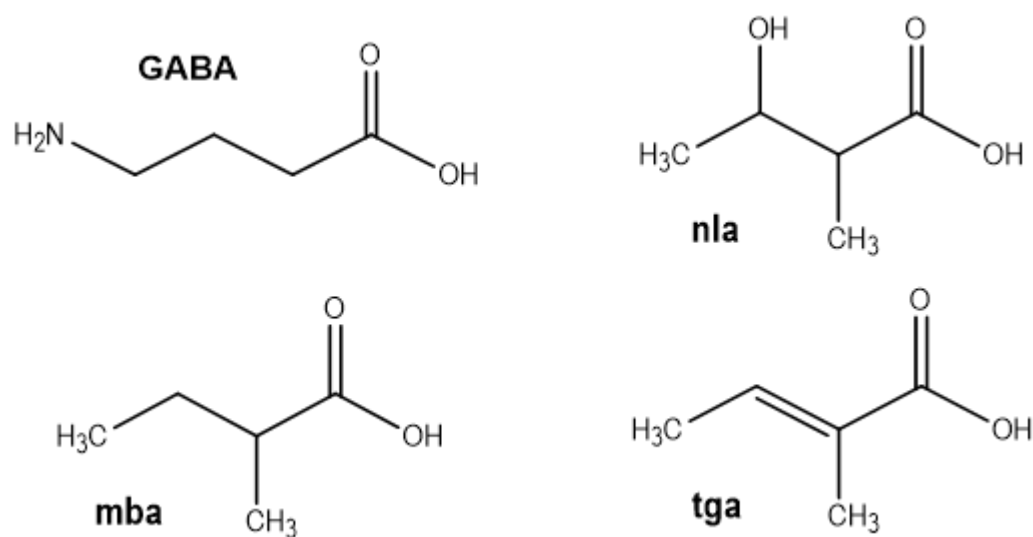


Figura 55. Estructura química de GABA, ácido nilico (nla), ácido 2-metilbutanoico (mba) y ácido tíglico (tga).

Es interesante observar que estos ácidos carboxílicos de cadena corta tienen una estructura similar al neurotransmisor GABA (Fig. 54), lo que sugiere que tal vez podrían estar relacionadas con la actividad farmacológica observada en SN. Finalmente, no se puede descartar que las diferencias que muestran estos glucósidos de resina con respecto a su mecanismo de acción, su efecto sobre la

liberación de GABA y su actividad neuroprotectora, estén relacionados con las características estructurales globales, principalmente por su conformación espacial.

5.2 Conclusión

De acuerdo con los ensayos *in vitro* e *in vivo*, escamonina 1 y tiriantina C son glicolípidos con actividad anticonvulsiva y neuroprotectora dosis-dependiente, relacionados con un aumento de la neurotransmisión inhibitoria al evocar un incremento de la concentración de GABA endógeno extracelular y la disminución de la actividad excitotóxica generada después de una crisis convulsiva. Posiblemente, a nivel celular, los glicolípidos afectan la transmisión GABAérgica por al menos dos mecanismos de acción diferentes: modificando la liberación de GABA (vía vesicular) o modulando su liberación mediante la función GAT y GABAB. Por su actividad anticonvulsiva en el modelo de PTZ, posiblemente escamonina 1 y tiriantina C modulan la actividad del receptor GABAA o compitan por el mismo sitio de unión a PTZ y picrotoxina. Además, los hallazgos histológicos sugieren que escamonina 1 y tiriantina C pudieran tener propiedad antiinflamatoria y antioxidante relacionada por la disminución de la activación glial.

Es importante destacar que los efectos de los glucolípidos están relacionados con factores tales como la dosis y las características estructurales, donde los ácidos grasos de cadena corta pudieran ser los motivos estructurales involucrados con su actividad en el SNC.

Finalmente, escamonina 1 y tiriantina C son biomoléculas cuyo uso potencial podría dirigirse al diseño de nuevos fármacos neuroprotectores y en el campo médico para el tratamiento alternativo de enfermedades neurodegenerativas.

5.3 Perspectivas

- Evaluar el efecto que tienen los glicoconjugados y /o los ácidos de cadena corta obtenidos de la hidrólisis de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la liberación de GABA.

- Determinar el efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la actividad de canales iónicos específicos y sobre la concentración intracelular de calcio.
- Estudiar el efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* sobre la modulación GABAérgica.
- Realizar un estudio farmacocinético de *escamonina 1* y *tiriantina C*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *escamonina 1* y *tiriantina C*.
- Estudiar el efecto de *escamonina 1* y *tiriantina C* en modelos de neurodegeneración.
- Hacer un análisis *in silico* detallado para identificar otras posibles actividades para *escamonina 1* y *tiriantina C*.

Referencias

1. Abarca C. (2000). Liberación de los ácidos glutámico y gamma aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso de acocil y ratón por efecto de la fracción tóxica del veneno de la escolopendra (*Scolopendra sp.*). CEIB-UAEM. *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
2. Achnine L., Pereda M. R., Iglesias P. R., Moreno S. R., Lotina H. B. (1999). Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum*; 106: 246–252.
3. Ariza S. Y., Rincón J. y Guerrero M. F. (2006). Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tytha* Leonard. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*; 35 (1): 106-119.
4. Arnason J. T., Mata R., Romeo T. J. (1995). *Phytochemistry of medicinal plants*. 1ra ed. Edit. Plenum Press. New York, United States of America; pp 97-103.
5. Arzimanoglou A., Hirsch E, Nehlig A., Castelnau P., Gressens P., Pereira de Vasconcelos A. (2002). Epilepsy and Neuroprotection: An illustrated review. *Epileptic Disord*; 3: 173-182.
6. Astudillo-Vázquez A., Mata^b R., Navarrete^b A. (2009). El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Rev. Latinoamer. Quím.*; 37/ 1.
7. Avoli M., Louvel J., Pumain R., Kohling R. (2005). Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Progress in Neurobiol.*; 77: 166–200.
8. Barakat L. y Bordey A. (2002). GAT-1 and Reversible GABA Transport in Bergmann Glia in Slices. *J. Neurophysiol.*; 88 (1): 1407–1419.
9. Barreto-Chang O. L. y Dolmetsch R. E. (2009). Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *Journal of Visualized Experiments*; 23.
10. Benke D., Zemoura K. y Maier P. J. (2002). Modulation of cell surface GABA_B receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J. Biol. Chem.*; 3 (4): 61-72.

11. Bento Abreu A. F. (2007). Estudio del receptor de la albúmina en astrocitos y su importancia en la respuesta al daño cerebral. *Formación. Fundación MAPFRE*.
12. Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J. y Gassmann M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol. Rev.*; 84: 835–867.
13. Bidaud I., Mezghrani A., Swayne L., Monteil A. y Lory P. (2006). Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1763 (11): 1169-1174.
14. Bowery N. G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J. P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T. I., y Enna S. J. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric Acid B Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Reviews*; 54 (2):247–264.
15. Buznego Rodríguez M. T. y Pérez Saad H. (2002). Efectos agudos del extracto del *Cestrum nocturnum* (galán de noche) sobre diferentes modelos de epilepsia experimental. *Rev. Cubana Plant Med.*; 7 (2):73-7.
16. Cardona Á. J., Paredes H. E., Fernández H. (2009). Characterization histopatological of gastritis associated to *Helicobacter spp* presence in stomachs of horses. *Rev. MVZ Córdoba* 14(2):1750-1755.
17. Carranza E. (2007). Contribución al conocimiento de las plantas del género *Ipomoea* (Convolvulaceae) en el estado de Guanajuato, México. *Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo complementario XVIII*; 1-74.
18. Castro García J. M. (2011). Mecanismo de acción de tiriantina I y ácido tiriantínico II, aislados de la raíz de *Ipomoea tyrianthina* Lindley sobre el sistema GABAérgico en corteza cerebral de ratón. CEIB-UAEM. *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
19. Catterall C. A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.*; 72 (4): S15-S48.
20. Catterall W. A. (2000). From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*. 26: 13-25.

21. Catterall W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Ann Rev Cell Dev Biol.*; 16: 521-555.
22. Cestèle S. y Catterall W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.*; 82 (9-10): 883-892.
23. Cestèle S., Yarov-Yarovoy V., Qu Y., Sampieri F., Scheuer T. y Catterall W. A. (2006). Structure and Function of the Voltage Sensor of Sodium Channels Probed by Scorpion Toxin. *The journal of biological chemistry*; 281 (30): 21332–21344.
24. Chávez Grimaldi I. M., Flores Chávez M. E., Chacón de Petrola M. R., Chávez Grimaldi R. J. (2005). Revisión: La Neuroprotección en Disfunción Neurológica Aguda. Nuevos Enfoques Terapéuticos Dentro del Campo de la Inmunología del Sistema Nervioso Central. *Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica*; 2(8):179-185.
25. Conti F., Melone M., Fattorini G., Bragina L. y Ciappelloni S. (2011). A role for GAT-1 in presynaptic GABA homeostasis? *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 5 (2): 1-4.
26. Denac H., Mevissen M. y Scholtysik G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*; 362: 453-479.
27. Díaz-Ruiz A. y Ríos C. (2012). Agents and neuroprotector mechanisms related to oxidative stress in brain stroke. Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXVI, 171 – 199, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>).
28. Doolen S., Blake C. B., Smith B. N. y Bradely T. K. (2012). Peripheral nerve injury increases glutamate-evoked calcium mobilization in adult spinal cord neurons. *Molecular Pain*; 8:56.
29. Dunlop J. (2002). Neurotransmitter Transporters: Two Busy Families. *Newsletter for Cell Signaling and Neuroscience Research. SIGMA RBI*; 18 (4):3-10.
30. Enna S. J. (2001). A GABAB Mystery: The Search for Pharmacologically Distinct GABAB Receptors. *Molecular Interventions*; 1(4): 208-218.

31. Eulenburg V. y Gomez J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Research Reviews*; 63: 103–112.
32. Gadea A. y López-Colomé A. M. (2001). Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J. Neurosci. Res.*; 63(6):461-468.
33. González Saray A. G. (2006). Deterioro neuropsicológico en niños con epilepsia. *Investigación en Salud*; 8 (1): 44 – 49.
34. Grynkiewicz G., Poenie M. y Tsien R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*; 260 (6): 3440–3450.
35. Gutierrez, M. C. y Delgado-Coello B. A. (1989). Influence of pipercolic acid on the release and uptake of [3H] GABA from brain slices of mouse cerebral cortex. *Neurochem. Res.*; 14:405-408.
36. Haines D. E. (2003). Principios de Neurociencia; 2º Edición. *Elsevier science and Churchill Livingstone*.
37. Hernández C. B. (2000). Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de dos miembros representativos del complejo mexicano de jalapas, especies de Convolvuláceas con propiedades purgantes como una evidencia para distinguir entre la auténtica raíz de jalapa y sus adulterantes. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de México. Mexico D. F.
38. Hernández-Carlos B., Bye R., y Pereda-Miranda R. (1999). Orizabins V-VIII, Tetrasaccharide Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *J. Nat. Prod.*; 62: 1096-1100.
39. Herrera E. (1994). *Bioquímica: biología molecular y bioquímica fisiológica*. Editorial Interamericana— McGraw Hill, Madrid, España. 2 (2): 1113— 1117.
40. Herrera-Ruiz M., Gutiérrez C., Jiménez-Ferrer J. E., Tortoriello J., Mirón G. y León I. (2007). Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from *Ipomoea stans* roots. *Journal of Ethnopharmacology*; 112: 243-247.

41. Huang L., Yang S., Liou C., Hung P., Lai M., Wang C. y Wang T. (2002). Pentylentetrazol-induced Recurrent Seizures in Rat Pups: Time Course on Spatial Learning and Long-term Effects. *Epilep.*; 43 (6): 567-573.
42. Kandel E. R., Schwartz J. H. y Jessell T. M. (2000). *Principios de neurociencia*. 4° Edición. Editorial Mc-Graw Hill.
43. Kren V. y Martínková L. (2001). Glycosides in Medicine: "The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity". *Current Medicinal Chemistry*; 8: 1303-1328.
44. Kumar G. P. y Khanum F. (2012). Revisión: Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy reviews*; 6(12): 81 – 90.
45. León-Rivera I., Castro J. M., Mirón-López G., Del Río-Portilla F., Enríquez R. G., Reynolds W. F., Estrada-Soto S., Rendón-Vallejo P., Gutiérrez M. C., Herrera-Ruiz M., Mendoza A., Vargas G. (2014). Resin glycosides from *Ipomoea tyrianthina* and their sedative and vasorelaxant effects. *J. Nat. Med.*; 68 (4): 655-667.
46. León-Rivera I., Mirón-López G., Estrada-Soto S., Aguirre-Crespo F., Gutiérrez M. C., Molina-Salinas G. M., Hurtado G., Navarrete-Vázquez G., Montiel E. (2009). Glicolipid ester-type heterodimers from *Ipomoea tyrianthina* and their pharmacological activity. *Biorganic and Medical Chemistry Letters*; (19):4652-4656.
47. León-Rivera I., Mirón-López G., Molina-Salinas G. M., Herrera-Ruiz M., Estrada-Soto S., Gutiérrez M. C., Alonso-Cortes D., Navarrete-Vázquez G., Yolanda Ríos M. y Said-Fernández S. (2008). Tyrianthinic Acids from *Ipomoea tyrianthina* and Their Antimycobacterial Activity, Cytotoxicity, and Effects on the Central Nervous System. *J. Nat. Prod.*; (71): 1686–1691.
48. Llorente I. L., Perez-Rodriguez D., Martínez-Villayandre B., Dos-Anjos S., Darlison M. G., Poole A. V., Fernández-López A. (2013). GABAA receptor chloride channels are involved in the neuroprotective role of GABA following oxygen and glucose deprivation in the rat cerebral cortex but not in the hippocampus. *Brain research*; 1533:141–151.
49. Longstaff A. (2000). The Instant Notes in Neuroscience. *BIOS Scientific Publishers, USA*.

50. Loo D., Eskandari S., Boorer K. J., Sarkar H. K. y Wright E. M. (2000). Role of Cl⁻ in Electrogenic NA⁺-coupled Cotransporters GAT1 and SGLT1. *The Journal of Biological Chemistry*; 275 (48): 37414-37422.
51. López-Hernández E., Bravo J. y Solís H. (2005). Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica. *Rev. Fac. Med. UNAM*; 48 (5): 201-209.
52. Luján R. (2004). Bases moleculares de la señalización neuronal. *Ciencia al Día Internacional*; 5(2): 1-19.
53. Macdonald R. L. y Kelly K. M. (1995). Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*. 36: S212.
54. Marban E., Yamagishi T. y Tomaselli G. F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *Journal of physiology*; 508 (3): 647-657.
55. Martin Ian L y Dunn Susan M J (2002). GABA Receptors. *Tocris Reviews*; 20.
56. Martínez-Martos J. M.; Ramírez-Expósito M. J.; Iribor-Ibabe C. y Peinado-Herreros J. M. (1998). Las neurotoxinas naturales como herramientas farmacológicas para el estudio del sistema nervioso central. *Rev. Neurol.*; 26 (152): 584-591
57. Massensini A. R., Romano-Silva M. A. y Gomez M. V. (2003). Sodium Channel Toxins and Neurotransmitter Release. *Neurochemical Research*; 28(10): 1607-1611.
58. Masson J., Sagné C., Hamon M., y Mestikawy S. (1999). Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews*; 51 (3): 439-464.
59. McNamara J. (2004). Fármacos eficaces para el tratamiento de las epilepsias (Capítulo 21). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*; 10^a edición; Vol. I; Editorial McGraw-Hill Interamericana, México.
60. Medel Matus J. S., Ramos Morales F. R., Correa Basurto J., Cruz Sánchez J. S., Saavedra Vélez M. V. y Velásquez Melgarejo V. (2010). Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje en el desarrollo de la epilepsia. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*; 44 (3): 329-35.

61. Mehta A. K. y Ticku M. K. (1999). An update on GABAA receptors. *Brain Res. Rev.* 29: 196-217.
62. Meinild A. K., Loo Donald D. F., Skovstrup S., Gether U. y MacAulay N. (2009). Elucidating Conformational Changes in the γ -Aminobutyric Acid Transporter-1. *The Journal of Biological Chemistry*; 284 (24): 16226–16235.
63. Meira M., Pereira da Silva E., David Jorge M., David Juceni P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*; 22(3): 682-713.
64. Meisler M. H. y Kearney J. A. (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *The Journal of Clinical Investigation*; 115 (8): 2010-2017.
65. Melamed N. y Kanner B. I. (2004). Transmembrane domains I and II of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-4 contain molecular determinants of substrate specificity. *Mol. Pharmacol.*; 65(6):1452-61.
66. Mirón-López G. (2007). Estudio analítico por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, de las resinas glucosídicas de *Ipomoea tyrianthina* Lindley, colectadas en tres estados de la República Mexicana. *CIQ-UAEM. Tesis de Doctorado*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
67. Mirón-López G., Herrera-Ruiz M., Estrada-Soto S., Aguirre-Crespo F., Vázquez-Navarrete L. y León-Rivera I. (2007). Resin Glycosides from the Roots of *Ipomoea tyrianthina* and Their Biological Activity. *J. Nat. Prod.*; (7): 557-562.
68. Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De-Waard M. y Sabatier, J. M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.*; 378: 717-726.
69. Nicholson G. M. (2007). Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*; 49: 490-512.
70. Noda N., Kogetsu H., Kawasaki T. y Miyahara K. (1990). Scammonins I and II, the resin glycosides of radix scammoniae from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*; 29 (11): 3565-3569.

71. Noda N., Tsuji K., Kawasaki T. Miyahara K, Hanazono H., Yang C. R. (1995). A novel resin glycoside, merremmin (tuguajalapin X dimer), from *Merremia Hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull*; 43 (6): 1061-1063.
72. Pereda-Miranda R. y Bah M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry*; 3(2):111-131.
73. Pereda-Miranda R., Fragoso-Serrano M., Escalante-Sánchez E., Hernández C., Linares E. y Robert Bye B. (2006). Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity. *J. Nat. Prod.*; 69: 1460-1466.
74. Pereda-Miranda R., Rosas-Ramírez D. y Castañeda-Gómez J. (2010). Resin Glycosides from the Morning Glory Family. A.D. Kinghorn et al. (eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Vol. 92.
75. Pereda-Miranda R., Villatoro-Vera R., Bah M. y Lorence A. (2009). Pore-forming activity of morning glory resin glycosides in model membranes. *Rev. Latinoamer. Quím.*; 37 (2): 144-154.
76. Porres Martínez M., Gómez-Serranillos M. P. y Carretero Accame M. E. (2010). Neuroprotective activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. Essential oil. *Ars. Pharm.*; 51 (3): 657-675.
77. Quintans Júnior L. J., Almeida Jackson R. G. S., Lima Julianeli T., Nunes X. P., Siqueira J. S., Gomes de Oliveira L. E., Almeida R. N., F. de Athayde-Filho P., Barbosa-Filho J. M. (2008). Plants with anticonvulsant properties - a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*; 18 (Supl.): 798-819.
78. Rencurosi A., Mitchell P. E., Cioci G., Pérez S., Pereda M. R. y Imberty A. (2004). Crystal Structure of Tricolorin A: Molecular Rationale for the Biological Properties of Resin Glycosides Found in Some Mexican Herbal Remedies. *Angewandte Chemie International Edition*; 43: 5918-5922.
79. Rho J. y Sankar R. (1999). The pharmacologic basis of antiepileptic drug action. *Epilepsia*; 40 (11):1471-1483.

80. Richerson G. B. y Wu Y. (2003). Dynamic Equilibrium of Neurotransmitter Transporters: Not Just for Reuptake Anymore. *J. Neurophysiol.*; 90: 1363–1374.
81. Risso S., DeFelice L. J. y Blakely R. D. (1996). Sodium-dependent GABA-induced currents in GAT₁ -transfected HeLa cells. *Journal of Physiology*; 490 (3): 691-702.
82. Rogawski M. y Löscher W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic condition. *Natur. Medic.*; 10 (7): 685-692.
83. Rzedowski G. C. y Rzedowzki J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México; pp. 132-135.
84. Sakmann B. y Neher E. (Eds) (1983). Single Channel Recording. *New York: Plenum*.
85. Sánchez Mauricio y Cárdenas Washington (2002). Produccion de anticuerpos policlonales contra el hongo causante de la sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*. *Revista Tecnológica*; 15 (1).
86. Sandor B., Keller Jr. R. W. y Zigmond M. J. (1989). Release of endogenous GABA can occur through Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent processes. *Neurochem. Int.*; 14 (4): 439-445.
87. Sarup A., Larsson O. M. y Schousboe A. (2003). GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. *Curr. Drug Targets CNS Neuro.l Disord.*; 2(4):269-277.
88. Saxena M., Saxena J., Nema R., Singh D. y Gupta A. (2013). Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 1 (6): 168-182.
89. Schwarz D. A., Barry G., Eliasof S. D., Petroski R. E., Conlon P. J., and Maki R. A. (2000). Characterization of g-Aminobutyric Acid Receptor GABA_B(1e), a GABA_B(1) Splice Variant Encoding a Truncated Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*; 275 (41): 32174–32181.
90. Siegel G., Agranoff B., Wayne R., Fisher S. y Uhler M. (1999). *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical espect*; 6^{ta} edición; Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

91. Sitges M., Possani L. D. y Bayó A. (1986). Noxiustoxin, A Short-Chain Toxin from the Mexican Scorpion *Centruroides noxius*, Induces Transmitter Release by Blocking K⁺ Permeability. *The Journal of Neuroscience*; 6 (6): 1570-1574.
92. Solís-Añez E., Delgado-Luengo W. y Hernández M. L. (2007). Autismo, cromosoma 15 y la hipótesis de disfunción GABAérgica. Revisión. *Invest. Clin.*; 48 (4): 529 – 541.
93. Tabullo De Robles J. (2012). Efectos de la administración intramuscular de veneno de *Scolopendra viridis* (Say, 1821) en la respuesta murina a estímulos térmicos y mediadores inflamatorios del dolor. CEIB_UAEM. *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
94. Takahashi K., Miyoshi S., Kaneko A. y Copenhagen D. R. (1995). Actions of Nipecotnic Acid and SKF89976A on GABA Transporter in Cone-Driven Horizontal Cells Dissociated from the Catfish Retina. *Japanese Journal of Physiology*; 45: 457-473.
95. Tapia R., Sitges M. y Morales E. (1985). Mechanism of the Calcium-Dependent Stimulation of Transmitter Release by 4-Aminopyridine in Synaptosomes. *Brain Research*; 361: 373-382.
96. Tripathi L. y Tripathi J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 2 (2): 243-253.
97. Villa-Ruano N., Pacheco-Hernández Y., Lara-Zaragoza E. B., Franco-Monsreal J., Cardeña-Bozziere I. M., Galván-Valencia O. T. y Ruiz-Gómez L. M. (2011). Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente. *Temas de Ciencia y Tecnología*; 15 (43): 13 – 20.
98. White H. S., Sarup A., Bolvig T., Kristensen A. S., Petersen G., Nelson N., Pickering D. S., Larsson O. M., Frølund B., Krogsgaard-Larsen P. y Schousboe A. (2002). Correlation between anticonvulsant activity and inhibitory action on glial gamma-aminobutyric acid uptake of the highly selective mouse gamma-aminobutyric acid transporter 1 inhibitor 3-hydroxy-4-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,2-benzisoxazole and its N-alkylated analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 302(2):636-644.

99. Wood M. D., Murkitt K. L., Rice S. Q., Testa T., Punia P. K., Stammers M., Jenkins O., Elshourbagy N. A., Shabon U., Taylor S. J., Gager T. L., Minton J., Hirst W. D., Price G. W. y Pangalos M. (2000). The human GABA_{B1b} and GABA_{B2} heterodimeric recombinant receptor shows low sensitivity to haclofen and saclofen. *British Journal of Pharmacology*; 131: 1050-1054.
100. Wu X., Zhao J., Zhang M., Li F., Zhao T. y Yang L. (2011). Sedative, hypnotic and anticonvulsant activities of the ethanol fraction from *Rhizoma Pinelliae Praeparatum*. *Journal of Ethnopharmacology*; 135 (1): 325-329.
101. Wu Y., Wang W., Díez-Sampedro A. y Richerson G. B. (2007). Nonvesicular Inhibitory Neurotransmission via Reversal of the GABA Transporter GAT-1. *J. Neuron.*; 56, 851–865.
102. Yu B., Luo J., Wang J., Zhang D., Yu S. y Kong L. (2011). Pentasaccharide Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.*; 74: 620–628.
103. Yu B., Luo J., Wang J., Zhang D., Yu S., Kong L. (2013). Pentasaccharide resin glycosides from *Ipomoea cairica* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*; 95: 421-427.
104. Zavala Tecuapetla Cecilia, López Meraz María Leonor (2011). Experimental models of epilepsy in the developing rat. *Revista eNeurobiología*; 2(4):190811.

Fuentes de internet

- www.kalipedia.com
- www.biologiacelularb.com.ar
- www.classicnatureprints.com
- www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, UNAM, 2014. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana).

Anexos

A: Purificación de los glicolípidos

1. Preparación de extractos de raíz de *Ipomoea tyrianthina*

Las raíces de las plantas colectadas de *Ipomoea tyrianthina* fueron cortadas en pedazos, secadas a la sombra a temperatura ambiente, y molidas. Posteriormente, fueron macerados lotes de 250 gramos de la raíz molida de cada región con diclorometano (CH_2Cl_2 , 3 cambios de 500 ml cada uno) y metanol (CH_3OH , 3 cambios de 500 ml cada uno) en forma consecutiva. Después de la etapa de extracción, el material fue filtrado y el disolvente fue eliminado a presión reducida mediante un evaporador rotatorio para la obtención de la jalapina (extracto soluble en diclorometano) y la convolvulina (extracto soluble en metanol).

2. Obtención de las resinas glicosídicas

2.1 *Escamonina 1*

El fraccionamiento primario de la jalapina mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice con tamaño de partícula de 70-210 μm (Merck), utilizando un sistema de elusión de CH_2Cl_2 - CH_3OH con proporciones de CH_2Cl_2 (100%), CH_2Cl_2 - CH_3OH (98:02, 97:03, 95:05, 94:06, 93:07, 90:10, 85:15, 80:20) y CH_3OH (100%). Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina con gel de sílice (CCF), realizada en cromatofolios de aluminio impregnados con una capa de gel de sílice 60 GF₂₅₄ de 0.25 de espesor (Merck), usando un sistema de elusión de CH_2Cl_2 - CH_3OH (90:10), y reveladas con una solución de ácido sulfúrico al 10 % y calentamiento.

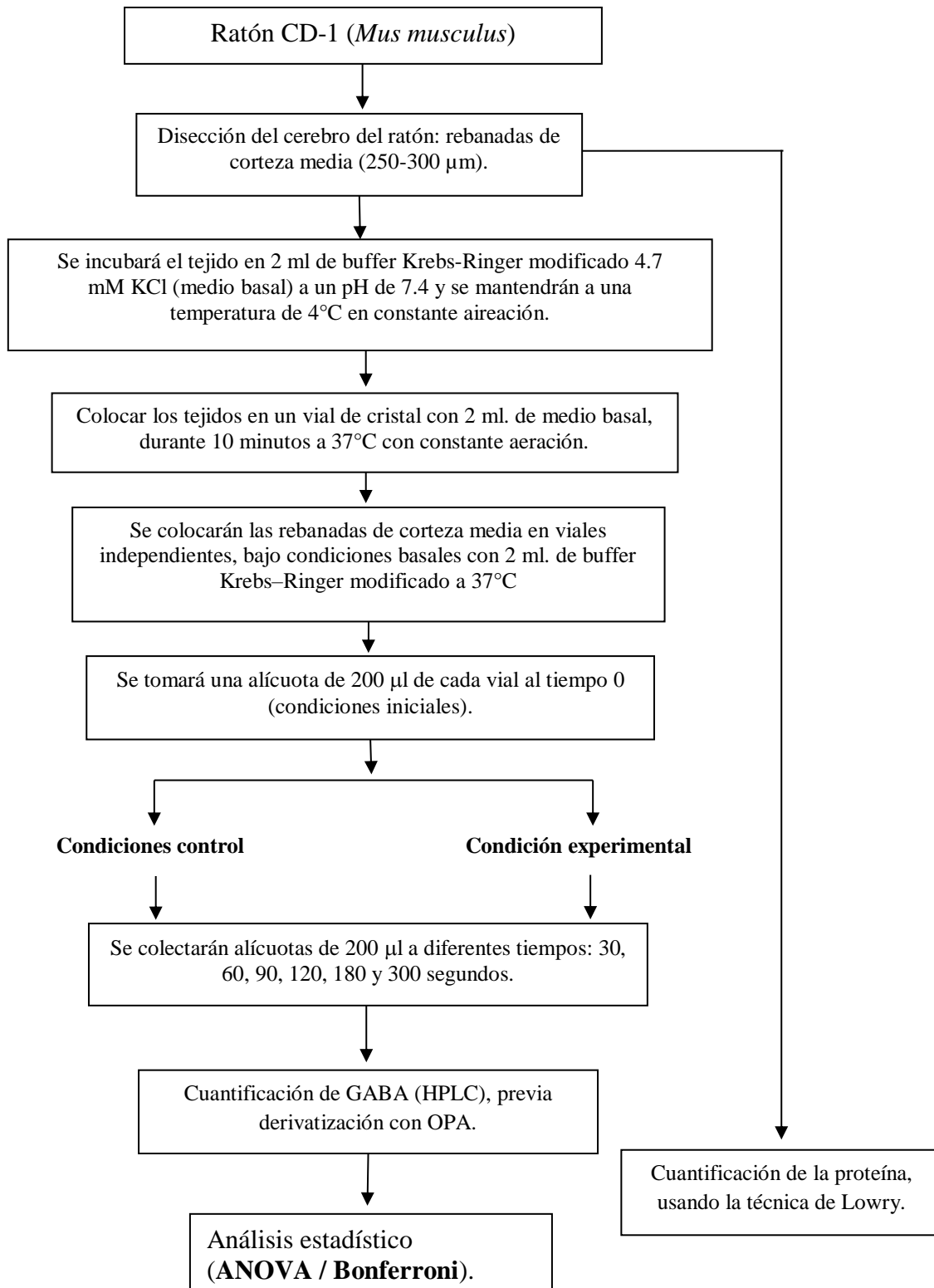
La purificación a partir de las fracciones obtenidas se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100, con un sistema de bombas binario y un detector de UV-Vis de longitud de onda variable. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna C-18 Ultrasil ODS (diámetro interno de 10 mm x 300 mm, tamaño de partícula de 5 μm , Altex), con una fase móvil CH_3CN - H_2O (80:20), a un flujo de 1 ml/min, a una concentración de muestra de 60 mg/ml, volumen de inyección de 100 μl , utilizando una longitud de onda de detección de 210 nm, a temperatura ambiente (25°C).

2.2 Tiriantina C

La convolvulina de *Ipomoea tyrianthina* se sometió a lavados con H₂O destilada (100%) con la finalidad de eliminar los compuestos hidrosolubles e impurezas, para poder separar únicamente la resina glicosídica soluble en CH₃OH. El fraccionamiento primario de la convolvulina se realizó mediante cromatografía en columna abierta utilizando como fase estacionaria dimetiloctadecilsilano (supelclean LC-18 de Supelco), y como fase móvil un sistema H₂O/CH₃OH (fase inversa) en diferentes proporciones: H₂O (100%), H₂O-CH₃OH (80:20, 60:40, 40:60, 20:80) y CH₃OH (100%), y monitoreando las fracciones obtenidas mediante CCF. Posteriormente, fueron eliminados los pigmentos presentes en las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna abierta utilizando como fase estacionaria carbón activado y una fase móvil de CH₃OH (100%).

A partir de las fracciones solubles al 100% en CH₃OH se realizó un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice con tamaño de partícula de 70-210 µm (Merck), utilizando un sistema de elusión de CH₂Cl₂-CH₃OH con proporciones de CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂-CH₃OH (97:3, 94:6, 91:9, 88:12, 85:15, 80:20, 50:50) y CH₃OH (100%), y monitoreando las fracciones obtenidas mediante CCF.

B: Diagrama de flujo de los ensayos de liberación.



C: Preparación del buffer Krebs-Ringer modificado (medios de incubación)

1. Preparación de medios de incubación

El medio de incubación utilizado para la incubación de las rebanadas de cerebro de ratón y los ensayos de liberación de neurotransmisor es un buffer Krebs-Ringer modificado, al que se le adiciona ácido aminoxiacético (AAO, 10.0 μ M) para evitar el metabolismo de GABA (Abarca, 2000).

Este medio simula las condiciones fisiológicas normales en las que se encuentra el tejido nervioso en el líquido cefalorraquídeo, el cual se mantiene en aeración constante (burbujeo) a pH de 7.4 y a una temperatura de 4°C hasta su utilización en los ensayos de liberación en donde la temperatura de incubación cambia a 37°C.

La incubación de las rebanadas de cerebro en este buffer (medio basal: 118.0 mM NaCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.18 mM MgSO_4 , 20.0 mM $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ y 5.6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) se toma como referencia en la liberación del neurotransmisor, siendo el control negativo. El control positivo que valida el diseño del ensayo liberación se plantea modificando el equilibrio osmolar del buffer (medio de liberación: 118.0 mM NaCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 47 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.18 mM MgSO_4 , 20.0 mM $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ y 5.6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), aumentando 10 veces la concentración de KCl y, por lo tanto, generando condiciones despolarizantes que permiten la liberación total de neurotransmisores.

D: Cuantificación de GABA

1. Derivatización y análisis cromatográfico de la muestra

La cuantificación del GABA se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC) con derivatización pre-columna con O-ftaldialdehído (*OPA*), el cual fue desarrollado para la detección y cuantificación de aminoácidos en pequeñas cantidades de muestra, permitiendo su detección selectiva y sensible en el rango del pmol (Jones y Gilligan, 1983). La derivatización de la muestra se describe en la siguiente tabla:

Muestra	20 μ L
O P A	20 μ L
<i>Agitar por 1 minuto.</i>	
CH ₃ COONa 0.1 M	360 μ L
Nota: <ul style="list-style-type: none">• Se obtienen al final 400 μL. de volumen, de los cuales se parte para realizar los cálculos correspondientes.• Solución OPA: O-ftaldialdehído 2.87 mM, CH₃OH 2.38 M, 2-mercaptoetanol 0.27 mM, Na₂B₄O₇*10H₂O 0.09 M.	

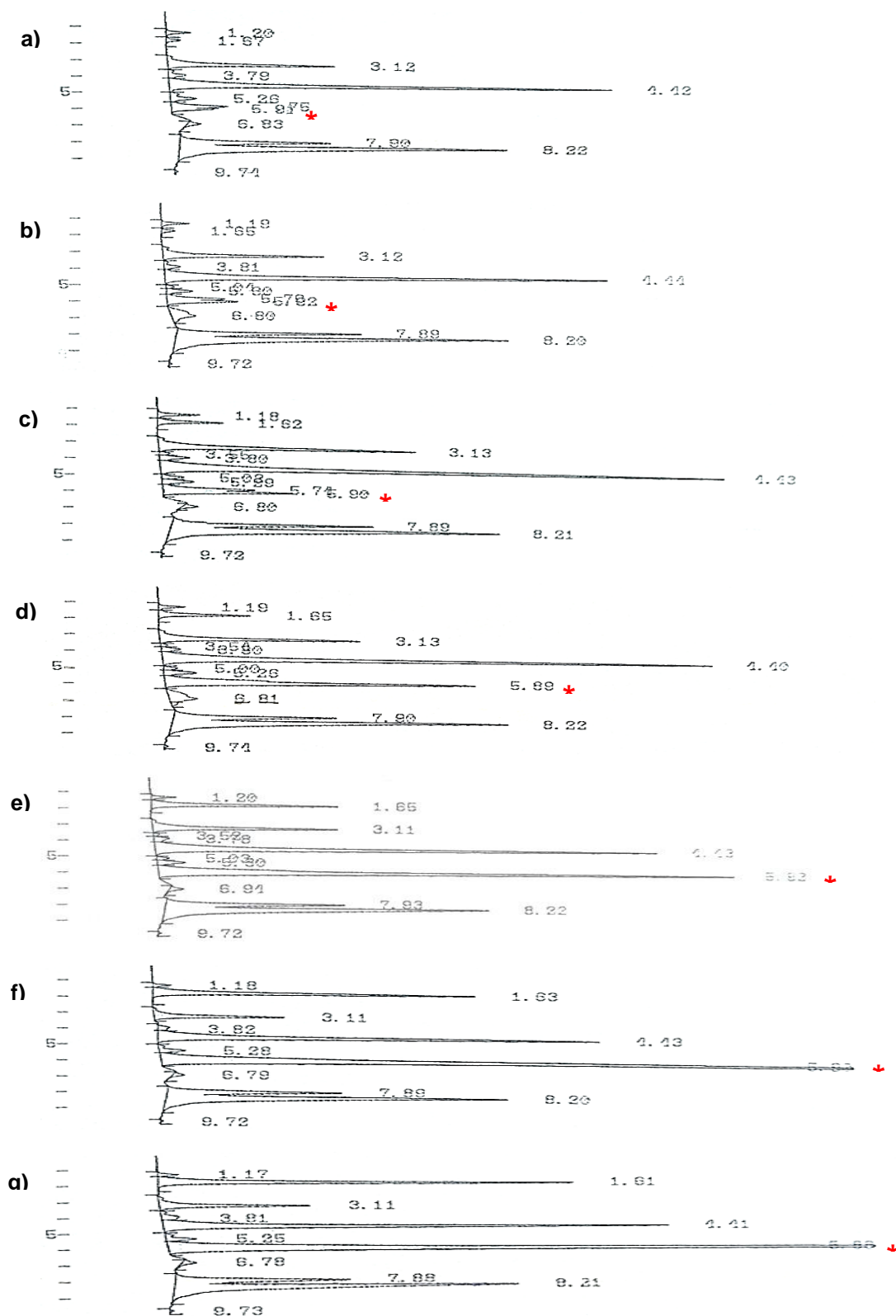
Para el análisis del contenido de GABA de cada muestra, se utilizó un cromatógrafo marca Merck-Hitachi, equipado con un detector de fluorescencia (longitud de onda 330 nm de excitación y 450 nm de emisión), usando una columna marca Cartridge - LiChrospher® 100 RP-C18 de 5 μ m en el tamaño de partícula, y se estableció un programa de gradiente de 80% solvente A (CH₃COONa 0.1 M, pH 7.0) a 100% solvente B (CH₃OH grado HPLC) en un tiempo de corrida de 10 minutos con un flujo de 1.5 ml/min (Abarca, 2000).

2. Curva de calibración de GABA

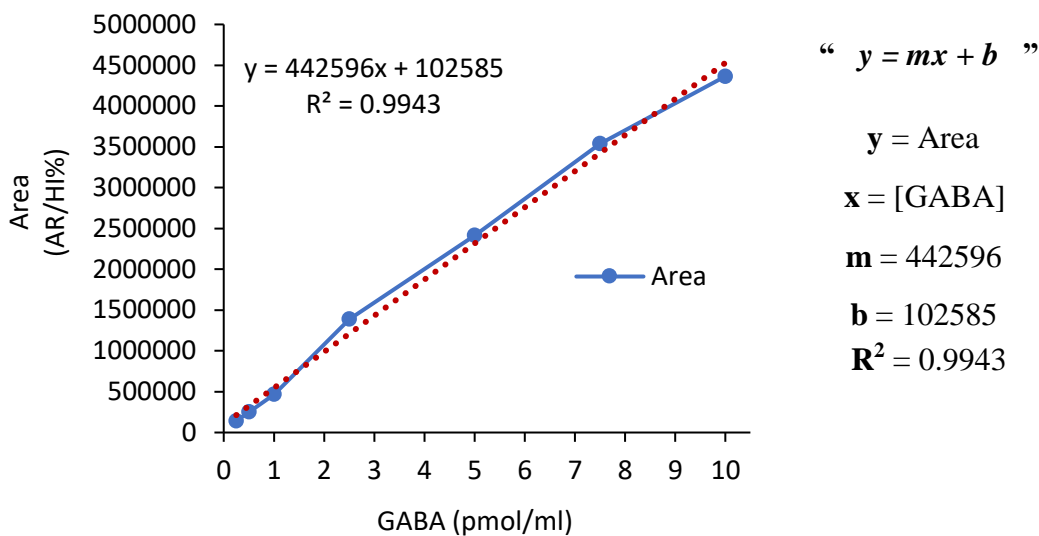
La cuantificación de GABA en cada alícuota se determinó con ayuda de una curva estándar, partiendo de muestras derivatizadas con concentraciones conocidas de GABA. La ecuación de regresión lineal fue usada para el cálculo de la concentración de GABA, y usando la ecuación de regresión lineal para los cálculos.

- a) Perfiles cromatográficos correspondientes a las soluciones estándares de GABA a concentraciones conocidas: a) 0.25, b) 0.5, c) 1.0, d) 2.5, e) 5.0, f) 7.5, g) 10.0. El asterisco rojo

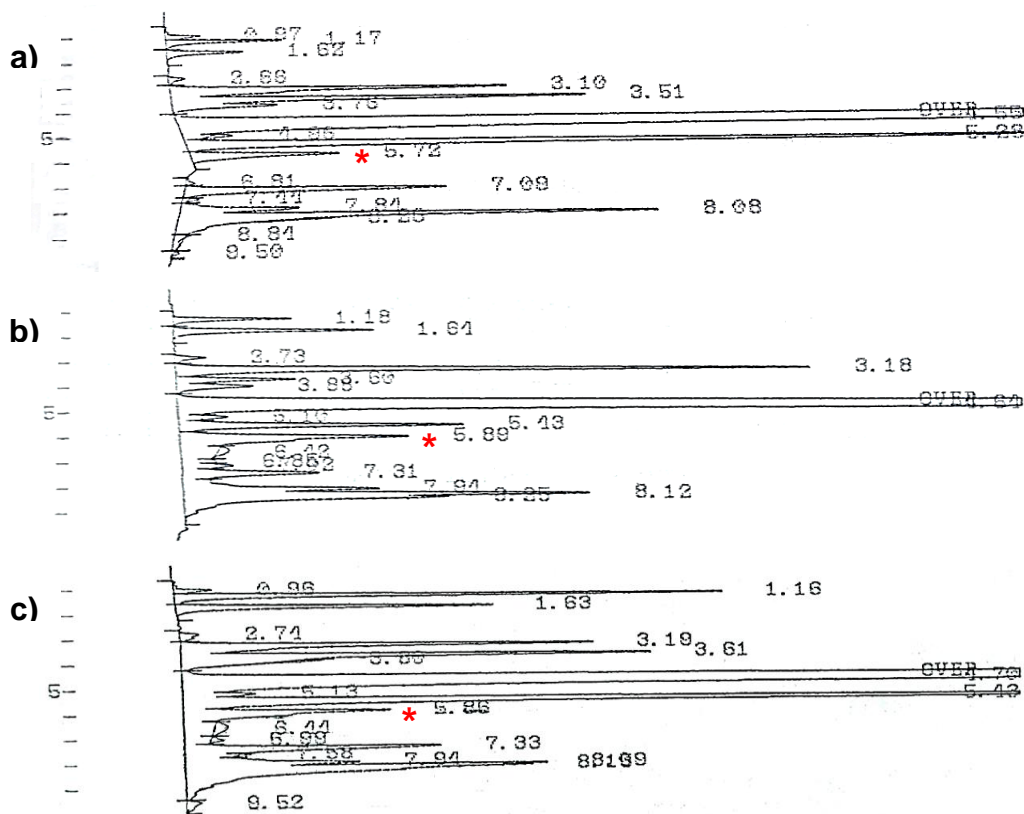
indica la señal correspondiente al tiempo de retención de GABA ($RT_{GABA}=5.89 \pm 0.2$ min), notándose el incremento del área con respecto a la concentración del estándar.



b) Comportamiento de los datos de una curva de calibración de GABA, línea de tendencia y valores obtenidos de la regresión lineal. Los cálculos fueron hechos a partir de las áreas obtenidas del análisis cromatográfico mostrado en a).



c) Perfiles cromatográficos obtenidos para los controles, a) negativo y b) positivo, y para uno de los glicolípidos usados, c) escamonia 1 (10 mg / ml).



d) Áreas obtenidas a partir del análisis cromatográfico mostrado en c) y el cálculo de la concentración de GABA de cada una, usando la formula general de la recta ($y=mx+b$): y = área; m = pendiente de la recta; x = concentración de GABA; b = ordenada al origen. El resultado final es expresado en pmol/ml de neurotransmisor con respecto a la concentración de proteína (mg/ml) de proteína de cada muestra.

Condición	Área (AR/HI%)	[GABA] (pmol / µl)	[GABA] (pmol / ml)	[Proteína] (µg / ml)	[GABA] (pmol / µg of protein)
CN	439253	0.03803	38.03333	551.39168	0.06898
CP	1276223	0.13259	132.58570	496.70830	0.26693
5A (10 mg/ml)	1270453	0.13293	131.93386	569.85066	0.23152

$$y = mx + b$$

||

$$x = \frac{y + b}{m}$$

$$y = \text{Area}$$

$$x = [\text{GABA}]$$

$$m = 442596$$

$$b =$$

E: Obtención y preparación de tejidos para histología

1. Obtención de los tejidos

Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la última dosificación con PTZ por medio de dislocación cervical, y se realizó la inyección intracardiaca de 10 µl de EDTA (4 mM, 4 °C) como anticoagulante. Inmediatamente se llevó a cabo la perfusión cardiaca con un volumen aproximado de 200 ml de solución salina (NaCl al 0.9%, 4 °C) y de 200 ml de solución fijadora (formaldehído al 10 %, 4 °C), para drenar la sangre circulante de los tejidos y preservar los órganos, respectivamente. Finalizada la perfusión, el cerebro de cada ratón fue removido, cortado sagitalmente (en hemisferios) y mantenido a 4 °C en formaldehído al 4 % (en un volumen 10 veces mayor a la del tejido) por un periodo de entre 36 horas a una semana para su fijación completa (Tabullo, 2012).

2. Preparación de los tejidos para histología

2.1 Deshidratación y aclaramiento

Una vez terminado el tiempo de fijación, es eliminado el exceso de formaldehído de los tejidos con agua corriente (30 minutos). Los tejidos son deshidratados pasándolos por varias soluciones de etanol (96°) de concentración creciente (60 %, 70 %, 80 % and 96 %, 30 minutos en cada una), seguido por etanol absoluto al 100 % (dos cambios, 1 hora cada uno). Para el proceso de aclaramiento, los tejidos fueron pasados por una solución de etanol absoluto – xilol (1:1, por 1 hora) y después por xilol al 100 % (dos cambios, 1 hora cada uno).

2.2 Inclusión en parafina

Después de la deshidratación, los cerebros fueron colocados en *cassettes* histológicos para realizar el proceso de impregnado con parafina fundida (70 °C) en dos pasos de 60 minutos cada uno, y colocados en moldes cúbicos de silicona para su inclusión. Una vez solidificada la parafina con el tejido incluido, que constituyen los bloques histológicos, se prosiguió con la obtención de los cortes histológicos (Tabullo, 2012).

2.3 Obtención de cortes histológicos

Los bloques histológicos fueron cortados usando un micrótopo rotatorio LEICA RM2265 (Leica Microsystems Inc.), obteniendo cortes sagitales de un espesor aproximado de entre 4–6 µm. Los cortes se tomaron con ayuda de un pincel, un portaobjetos y etanol (4°C), para después llevarlos a un baño de flotación (agua y grenetina, a 40-45°C) para extenderlos y eliminar pequeños pliegues y

arrugas. Finalmente, se transfirieron a portaobjetos previamente tratados con silano (agente adherente) y secados a temperatura ambiente.

2.4 Silanización de portaobjetos

Se acomodan portaobjetos rotulados en una castilla de metal, los cuales se sumergirán en una solución de silano (Trimetoxisilano) al 2% en acetona por 6 minutos. Posteriormente, se enjuagan por 3 minutos en agua destilada (dos veces). Finalmente, se dejan secar las laminillas en una estufa a 40°C o a temperatura ambiente. Se aconseja usar las laminillas pasando de 24 a 48 horas después de la silanización, para tener mejor adherencia de las muestras.

F: Técnica histológica

1. Desparafinado y rehidratación de muestras

Para eliminar la parafina de los cortes histológicos, las muestras se sumergen en Xilol al 100% por 20 minutos, hasta que las muestras queden transparentes.

Una vez terminada la desparafinación de las muestras, los tejidos son rehidratados pasándolos por las siguientes soluciones:

- ✓ Etanol absoluto – xilol (1:1, 3 minutos).
- ✓ Etanol absoluto al 100 % (dos cambios, 3 minutos cada uno).
- ✓ Etanol (96°) al 100% (dos cambios, 3 minutos cada uno).
- ✓ Etanol (96°) al 80% (3 minutos).
- ✓ Etanol (96°) al 60% (3 minutos).
- ✓ Agua destilada (dos cambios, 3 minutos cada uno).

2. Tinción de Hematoxilina – Eosina (HE)

Las muestras previamente desparafinadas y rehidratadas se tratarán de la siguiente forma:

- ✓ Introducir las muestras en Hematoxilina de Harris (previamente filtrada) por 4 minutos.
- ✓ Enjuagar con agua corriente 3 veces o hasta que el agua esté libre de coloración.
- ✓ Sumergir inmediatamente en agua amoniacal (NH₄OH al 1%) por 15 segundos o hasta que se observe un viraje en la coloración (de morado a azul) de las muestras.
- ✓ Enjuagar con agua corriente 3 veces.
- ✓ Introducir las muestras en Eosina por 1 minuto.
- ✓ Enjuagar con agua corriente 3 veces o hasta que el agua esté libre de coloración.

Una vez terminada la tinción, las muestras son deshidratadas y aclaradas de la siguiente forma:

- ✓ Introducir las muestras en etanol al 80 % y 100 % por 3 minutos, dos veces cada uno.
- ✓ Enjuagar dos veces en etanol absoluto al 100 % por 3 minutos cada uno.
- ✓ Pasar las muestras a una solución de etanol absoluto – xilol (1:1, por 3 minutos).
- ✓ Introducir las muestras en xilol al 100 % por 3 minutos, dos veces.

Finalmente se realiza el montaje de las muestras, colocando una gota de resina DPX al centro del corte y un cubreobjetos. Se limpian los excesos de resina con xilol y se dejan secar totalmente las muestras para su posterior análisis microscópico.

3. Tinción de Plata – Amino – Cúprico (Técnica modificada por Anthony Benkovic)

Esta tinción es utilizada para cortes histológicos (5-7 μ m) fijados en paraformaldehído y bloque en parafina. Partiendo de muestras desparafinadas y rehidratadas (en soluciones alcohólicas de concentración decreciente hasta agua destilada), las muestras se procesan de la siguiente forma:

- ✓ Se pasan a la solución *Preimpregnante* previamente calentada a 48°C y se dejan incubar toda la noche.
- ✓ Al día siguiente, las laminillas se enjuagan dos veces con acetona o con agua destilada durante 1 minuto cada cambio.
- ✓ Se incuban por 25 minutos en solución *Impregnante*, previamente calentada y en constante movimiento.
- ✓ Se lavan rápidamente en agua destilada (rápidamente meter y sacar).
- ✓ Se pasan a la solución reductora (previamente calentada a 32°C) de 3-5 minutos, agitando lentamente.
- ✓ Se enjuagan en agua destilada durante 5 minutos.
- ✓ Se pasan a solución colorante *Nuclear Fast-Red* 0.1% en $Al_2(SO_4)_3$ al 5%, durante 30 minutos.
- ✓ Se lavan rápidamente en agua destilada.

Nota: Las soluciones *Preimpregnante* e *Impregnante* se preparan de acuerdo con lo descrito por Olmos *et al.* (1994).

Una vez terminada la tinción, las muestras son deshidratadas y aclaradas de la siguiente forma:

- ✓ Introducir las muestras en etanol al 80 % y 100 % por 3 minutos, dos veces cada uno.
- ✓ Sumergir en etanol absoluto al 100 % (dos cambios, de 3 minutos cada uno).
- ✓ Pasar las muestras a una solución de etanol absoluto – xilol (1:1, por 3 minutos).
- ✓ Introducir las muestras en xilol al 100 % por 3 minutos, dos veces.

Finalmente se realiza el montaje de las muestras, colocando una gota de resina DPX al centro del corte y un cubreobjetos. Se limpian los excesos de resina con xilol y se dejan secar totalmente las muestras para su posterior análisis microscópico.

4. Técnica inmunohistoquímica

Esta técnica es utilizada para cortes histológicos fijados en paraformaldehído e incluidos en parafina. Las muestras deben ser desparafinadas y rehidratadas (en soluciones alcohólicas de concentración decreciente hasta agua destilada).

Primero se realiza la recuperación antigénica de la siguiente forma:

- ✓ Colocar las muestras en recipientes Köplins de plástico, con buffer de citrato de sodio + tritón al 0.2% (pH 6)
- ✓ Hervir por 1 minuto en olla de presión.
- ✓ Dejar enfriar a temperatura ambiente o en baño de agua fría.
- ✓ Enjuagar con buffer de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.4) por 5 minutos, dos veces.

Después se elimina la actividad peroxidasa de la muestra:

- ✓ Agregar solución de peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos.
- ✓ Enjuagar con PBS 0.1 M pH 6, 2 veces.

Se realiza un bloque antigénico para evitar la unión inespecífica:

- ✓ Marcar el contorno de las muestras con un lápiz hidrofóbico.

- ✓ Colocar 50 µl de albúmina al 2% en cada corte e incubar por 60 minutos en una cámara húmeda cerrada.
- ✓ Enjuagar con PBS 0.1 M pH 6.

Posteriormente se incuba con el anticuerpo primario:

- ✓ Agregar 50 µl del anticuerpo a cada corte e incubar por un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C en una cámara húmeda cerrada.
- ✓ Enjuagar con PBS 0.1 M pH 6.

Después se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo secundario:

- ✓ Agregar 50 µl del anticuerpo marcado con biotina (“Biotinylated link”, kit Dako) por cada corte e incubar por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda cerrada.
- ✓ Enjuagar con PBS 0.1 M pH 6.

Inmediatamente se hace la incubación con estreptavidina-peroxidasa:

- ✓ Agregar 50 µl del anticuerpo marcado con biotina (“Streptavidin-HRP”, kit Dako) por cada corte e incubar por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda cerrada.
- ✓ Enjuagar con PBS 0.1 M pH 6.

Posteriormente se realiza el revelado:

- ✓ Agregar 50 µl de solución reveladora DAB (“diaminobencidina” + cromógeno, kit Dako) a cada corte y esperar el cambio de color (a un tono café claro) por no más de 10 minutos.
- ✓ Enjuagar con PBS 0.1 M pH 6.

Una vez terminado el revelado de las muestras, se hace la una contratinción con Hematoxilina:

- ✓ Se lavan las laminillas con agua corriente por 5 minutos y después se sumergen por 3 minutos en Hematoxilina de Harris previamente filtrada.
- ✓ Enjuagar 3 veces con agua corriente.

Después de la tinción, las muestras son deshidratadas y aclaradas de la siguiente forma:

- ✓ Introducir las muestras en etanol al 80 % y 100 % por 3 minutos, dos veces cada uno.
- ✓ Sumergir en etanol absoluto al 100 % (dos cambios, de 3 minutos cada uno).
- ✓ Pasar las muestras a una solución de etanol absoluto – xilol (1:1, por 3 minutos).
- ✓ Introducir las muestras en xilol al 100 % por 10 minutos, dos veces.

Finalmente se realiza el montaje de las muestras, colocando una gota de resina DPX al centro del corte y un cubreobjetos. Se limpian los excesos de resina con xilol y se dejan secar totalmente las muestras para su posterior análisis microscópico.

Publicaciones



Resin glycosides from *Ipomoea tyrianthina* and their sedative and vasorelaxant effects

Ismael León-Rivera · José Manuel Castro · Gumersindo Mirón-López · Federico del Río-Portilla · Raúl G. Enríquez · William F. Reynolds · Samuel Estrada-Soto · Priscilla Rendón-Vallejo · María del Carmen Gutiérrez · Maribel Herrera-Ruiz · Angeles Mendoza · Gabriela Vargas

Received: 24 February 2014 / Accepted: 23 April 2014
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer Japan 2014

Abstract The methanol-soluble extract from the root of *Ipomoea tyrianthina* was studied in order to isolate compounds with activity on the central nervous system and vasorelaxant effects. Chromatographic methods were used to isolate and purify seven new glycolipids (2–8). The structures of compounds 1–8 were elucidated by a combination of NMR spectroscopy and mass spectrometry. Tyrianthinoic acid (1) is a glycosidic acid composed of a linear pentasaccharide core bonded to a 11-hydroxyhexadecanoic acid. The structure of tyrianthinoic acids III (2), IV (3), and V (4) consists of a partially acylated tyrianthinoic acid. Tyrianthinoic acid VI (8) is a tetrasaccharide core bonded to a jalapinic acid, acylated by a 2-methyl-3-hydroxybutanoic acid. Tyrianthins C (5), D (6), and E (7) are ester-type heterodimers of scammonic acid A with different acylating residues in the two monomeric units. The macrolactonization site was located at C-3 of the rhamnose unit. The position of the ester linkage for monomeric unit B on the macrocyclic unit A was

established at C-4 of the terminal quinovose. Compounds 5–7 increased the sleeping time induced by pentobarbital and the release of gamma-aminobutyric acid in brain cortex. In addition, compounds 5–7 showed significant in vitro relaxant effects on aortic rat rings, in endothelium- and concentration-dependent manners.

Keywords Resin glycoside · Convolvulin · *Ipomoea tyrianthina* · Sedative · Vasorelaxant

Introduction

The so-called resin glycosides have been isolated principally from the family Convolvulaceae. Resin glycosides are classified into an ether-soluble fraction called jalapin and an ether-insoluble one called convolvulin [1]; they consist of a mixture of glycolipids. Most of the glycolipids contain a hydroxy-fatty acid bonded to an oligosaccharide

I. León-Rivera (✉) · G. Vargas
Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico
e-mail: ismaelr@uaem.mx

J. M. Castro · M. del Carmen Gutiérrez
Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

G. Mirón-López
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 41 por 26 y 28, Col. Industrial, Mérida, Yucatán, Mexico

F. del Río-Portilla · R. G. Enríquez · A. Mendoza
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Coyoacán, Distrito Federal, Mexico

W. F. Reynolds
Department of Chemistry, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3H6, Canada

S. Estrada-Soto · P. Rendón-Vallejo
Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

M. Herrera-Ruiz
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS, Argentina 1, Col. Centro, 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico

core (partially acylated by short chain acids) forming a macrolactone ring. In Mexico, the genus *Ipomoea* of the family Convolvulaceae includes a great number of ornamental, medicinal, and nutritional species [2].

The root of *Ipomoea tyrianthina* Lindley (syn. *Ipomoea orizabensis*; Convolvulaceae) is popularly known in Mexico as “raíz de escamonea” (scammony root). This root has been used in Mexican traditional medicine for treating epileptic seizures, as an anticonvulsant, sedative, purgative, abortive, and hypotensor, and for the treatment of renal disorders [2, 3]. The intraperitoneal (i.p.) administration of the jalapin from *I. tyrianthina* to mice produced an anxiolytic effect, reduced spontaneous motor activity, protected against pentylenetetrazole-induced seizures, increased the hypnotic effect induced by pentobarbital, and was able to increase the release of gamma-aminobutyric acid (GABA) in brain cortex [4]. Previous reports have described the isolation and characterization of glycolipids from the jalapin of *I. tyrianthina*. The chemical structure of these glycolipids contains an 11-hydroxy-hexadecanoic acid bonded to a tetrasaccharide core (partially acylated by short chain acids) forming a macrolactone ring [4–7]. We have also described the isolation and characterization of tyrianthinic acids I and II, and tyrianthins A and B (glycolipid ester type heterodimers) from the convolvulin of *I. tyrianthina* [8, 9].

In a continuing investigation on secondary metabolites with biological activity on central nervous system from *Ipomoea* species, we reinvestigated the resin glycosidic content from the root of *I. tyrianthina*. We report herein the isolation and characterization of seven new glycolipid compounds 2–8, and their biological activity on some central nervous system models and as vasodilators.

Results

The roots of *I. tyrianthina* were powdered and extracted with dichloromethane. The residual material was extracted with methanol. The resin glycoside insoluble in ether (convolvulin) was isolated from the methanol-soluble extract by column chromatography on reversed-phase (C₁₈) silica gel. The more abundant fractions containing resin glycosides were further separated using preparative reversed-phase HPLC. This procedure allowed purification of compounds 2–8.

Compounds 2–4 were saponified and yielded a water-soluble compound and an organic solvent-soluble fraction. The organic-soluble fraction was analyzed by GC–MS, allowing the identification of 2-methylbutanoic and 2-methyl-3-hydroxybutanoic (nilic) acids as the esterified carboxylic acids by comparison with authentic samples. The water-soluble glycosidic acid (1) obtained was

hydrolyzed and analyzed by HPLC for its sugar content, allowing the identification of the monosaccharides glucose, quinovose (3×), and rhamnose.

The molecular formula of compound 1 (C₄₆H₈₂O₂₄) was determined by HRFABMS. The negative-ion FABMS of the new glycosidic acid showed the pseudomolecular ion [M–H][–] at *m/z* 1017 and the loss of one methylpentose unit afforded the peak at *m/z* 871 [1017–146 (methylpentose unit)][–], while the peak at *m/z* 579 was 292 mass units lower than 871 and represented the loss of two methylpentose units. The fragment ion at *m/z* 417 represented the loss of a glucose unit from the peak at *m/z* 579. The further loss of a methylpentose unit gave a peak at *m/z* 271, corresponding to the aglycon anion, 11-hydroxyhexadecanoic acid (jalapinolinic acid). These data suggested that compound 1 was a jalapinolinic acid moiety bonded through a glycosidic bond to a pentasaccharide core consisting of four deoxyhexose units and one hexose unit.

The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of compound 1 show characteristic signals of resin glycosides. These spectra allowed the identification of five anomeric positions at δ_H 4.30 (1H, d, Qui; δ_C 102.1); 4.92 (1H, db, Glc; δ_C 97.9); 5.32 (1H, d, Rha; δ_C 100.2); 4.67 (1H, d, Qui'; δ_C 104.0); and 5.22 (1H, d, Qui''; δ_C 101.9). COSY and TOCSY spectra permitted the assignment of the signals of the nonanomeric protons in each monosaccharide unit. Carbon signals of each saccharide unit were assigned by the single bond ¹H–¹³C correlations using the HSQC NMR experiment, permitting the identification of three quinovopyranosyl, one rhamnopyranosyl, and one glucopyranosyl units in compound 1. The anomeric configurations for the sugar units were assigned as β for glucopyranosyl and quinovopyranosyl and α for rhamnopyranosyl from their ³J_{H1–H2} of 7.7, 7.6, and 1.4 Hz, and ¹J_{C1–H1} of 158, 159, and 169 Hz, respectively. The inter-glycosidic connectivities were established on the basis of long-range heteronuclear coupling correlations (³J_{CH}) in the HMBC spectrum between C-1 (δ_C 102.1) of Qui with H-11 (δ_H 3.56) of aglycone, C-1 (δ_C 97.9) of Glc with H-2 (δ_H 3.58) of Qui, C-1 (δ_C 100.2) of Rha with H-2 (δ_H 3.39) of Glc, C-1 (δ_C 104.0) of Qui' with H-4 (δ_H 3.57) of Rha, and C-1 (δ_C 101.9) of Qui'' with H-4 (δ_H 3.99) of Qui'. The position of the jalapinolinic acid moiety in the oligosaccharide core was determined by the correlation between jalapinolinic acid H-11 and Qui H-1 in a ROESY NMR spectrum. The structure of compound 1 (named tyrianthinoic acid) was therefore characterized as (11S)-hydroxyhexadecanoic acid 11-*O*-β-D-quinovopyranosyl-(1 → 4)-*O*-β-D-quinovopyranosyl-(1 → 4)-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-*O*-β-D-quinovopyranoside. Compound 1 represents a new linear glycosidic acid; the other linear pentasaccharide glycosidic acid previously reported has a different sequence of sugars [10].

The molecular formula of compounds **2** and **3** was the same ($C_{56}H_{98}O_{27}$), and for compound **4** was $C_{61}H_{106}O_{29}$ as determined by HRFABMS. The negative-ion FABMS showed the pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 1201 for compounds **2** and **3**, and at m/z 1301 for compound **4**. The difference of 100 mass units from m/z 1201 for **2** and **3** and m/z 1301 for **4** suggests that compound **4** is similar to compounds **2** and **3**, but with an extra niloyl group. The characteristic signals of glycosidic cleavage of the sugar moieties yielded peaks at m/z 987 [1017–146 (methylpentose unit)]⁻, m/z 825 [1017–292 (2 methylpentose units)]⁻, m/z 417 [579–162 (hexose unit)]⁻, and m/z 271 [417–146 (methylpentose unit)]⁻. These data suggested that the structure of compounds **2–4** contains a jalapinic acid moiety glycosidically bonded to a pentasaccharide core.

The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of compounds **2–4** were similar between them. In the HSQC spectrum it was possible to identify the chemical shifts of five anomeric positions between δ_H 4.20 and 5.20 corresponding to the carbon signals at δ_C 105.0–97.0. Four doublet signals were observed between δ_H 1.10 and 1.31 corroborating the presence of four methylpentose units in compounds **2–4**. COSY and TOCSY NMR spectra of compounds **2–4** allowed the assignments of the nonanomeric protons in each monosaccharide unit, and all carbons were assigned by HSQC experiments. This procedure allowed the identification of three quinovopyranosyl, one rhamnopyranosyl, and one glucopyranosyl units in compounds **2–4** according to their glycosidic acid (**1**). The inter-glycosidic connectivities in compounds **2–4** were confirmed by the long-range heteronuclear coupling correlations (³ J_{CH}) in the HMBC spectrum: C-1 of Qui with H-11 of aglycone, C-1 of Glc with H-2 of Qui, C-1 of Rha with H-2 of Glc, C-1 of Qui' with H-4 of Rha, and C-1 of Qui'' with H-4 of Qui'. These studies also permitted establishment of the sites of the ester linkages using long-range heteronuclear coupling correlations (³ J_{CH}): for compound **2**, H-2 (δ_H 5.10) of Rha with C-1 (δ_H 175.1) of a 2-methylbutanoyl moiety, and H-4 (δ_H 4.50) of Qui'' with C-1 (δ_H 175.8) of a niloyl moiety; for compound **3**, H-6,6a (δ_H 4.25, 4.40) of Glc with C-1 (δ_H 175.9) of a niloyl moiety, and H-2 (δ_H 5.10) of Rha with C-1 (δ_H 175.2) of a 2-methylbutanoyl moiety; and for compound **4**, H-6,6a (δ_H 4.25, 4.40) of Glc with C-1 (δ_H 175.8) of a niloyl moiety, H-2 (δ_H 5.10) of Rha with C-1 (δ_H 175.3) of a 2-methylbutanoyl moiety, and H-4 (δ_H 4.56) of Qui'' with C-1 (δ_H 175.7) of a niloyl moiety.

Tyrianthinic acid VI (**8**) and tyrianthins C (**5**), D (**6**), and E (**7**) were saponified and yielded a water-soluble compound and an organic solvent-soluble fraction. The organic-soluble fraction was analyzed by GC–MS, allowing the identification of 2-methylbutanoic, 2-methylbutenoic, and 2-methyl-3-hydroxybutanoic acids, by comparison with authentic samples. The water-soluble glycosidic acid obtained from compounds **5–8** was identified as scammonic acid A, previously reported

from *I. tyrianthina*, *Ipomoea stans*, and *Convolvulus scammonia* [4, 11, 12].

In the HRFABMS (positive-ion mode) the molecular formula of tyrianthins C (**5**), D (**6**), and E (**7**) were determined from the pseudomolecular ions $[M + Na]^+$ at m/z 1916.0019 ($C_{90}H_{156}NaO_{41}$), m/z 1897.9914 ($C_{90}H_{154}NaO_{40}$), and m/z 1998.0438 ($C_{95}H_{162}NaO_{42}$), respectively. The negative-ion FABMS produced the pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at $m/z = 1891$, $m/z = 1873$, and $m/z = 1973$ for compounds **5**, **6**, and **7**, respectively; the cleavage of an ester-type heterodimer resulted in the diagnostic peak $[M\text{-unit B}]^-$ at m/z 1036, while for **6**, this peak was observed at m/z 936; fragments produced by the elimination of a niloyl and a 2-methylbutanoyl residue are observed at m/z 936 [m/z 1036– $C_5H_8O_2$]⁻ and m/z 852 [m/z 936– C_5H_8O]⁻ for compounds **5** and **7**. The glycosidic cleavage of the sugar moieties yielded peaks at m/z 705 [m/z 852–145 ($C_6H_9O_4$)]⁻, 561 [m/z 705–144 ($C_6H_8O_4$)]⁻, 417 [m/z 561–144 ($C_6H_8O_4$)]⁻, and 271 [m/z 417–146 ($C_6H_{10}O_4$)]⁻ for compounds **5–7**.

The anomeric region of the ¹H-NMR (δ_H 4.3–5.5) and ¹³C-NMR (δ_C 95–105) spectra of compounds **5–7** showed 8 anomeric signals. COSY and TOCSY NMR spectra were used to assign the ¹H chemical shift of each monosaccharide unit (Table 2). The ¹³C chemical shifts of compounds **5–7** (Table 3) were assigned by the HSQC experiment. In this way, it was possible to corroborate the presence of two quinovopyranosyl, one glucopyranosyl, and one rhamnopyranosyl units, in each monomeric unit of compounds **5–7**. The anomeric configurations for the sugar units were assigned as β for glucopyranosyl and quinovopyranosyl and α for rhamnopyranosyl from their values of ³ J_{H1-H2} , and ¹ J_{C1-H1} . The inter-glycosidic connectivities in compounds **5–7** were confirmed by the long-range heteronuclear coupling correlations (³ J_{CH}) in the HMBC spectrum: C-1 of Qui with H-11 of aglycone, C-1 of Glc with H-2 of Qui, C-1 of Rha with H-2 of Glc, and C-1 of Qui' with H-4 of Rha. All these results were in concordance with their glycosidic acid. The long-range heteronuclear coupling correlations (³ J_{CH}) in the HMBC spectrum of compounds **5–7**, also permitted establishment of the sites of the ester linkages using long-range heteronuclear coupling correlations (³ J_{CH}). The carbonyl resonances at δ_C 173.6 (compound **5**) and δ_C 173.7 (compounds **6** and **7**) were assigned to the unit A macrolactone due to its ² J_{CH} coupling with the C-2 diastereotopic methylene protons centered at δ_H 2.26–2.47. The macrolactonization site at C-3 of the rhamnose unit was established by the observed ³ J_{CH} correlation between these carbonyl carbons and its proton (δ_H 5.58) in compounds **5–7**. The ester-type linkage established by the acyclic unit B at the macrocyclic unit A was identified by ³ J_{CH} correlation between the carbonyl group for the ester δ_C 173.6 (compound **5**) and δ_C 173.7 (compounds **6** and **7**) unit B, and H-4 of the terminal quinovose unit (δ_H

4.26 ppm). For tyrianthin C (**5**), the 2-methylbutanoyl residue in unit A (δ_C 175.0) was located at C-2 of the rhamnose unit (δ_H 5.54), and the niloyl residue (δ_C 175.2) in unit A was located as the acylating group at positions C-6 (δ_H 4.16) of the glucose unit. Tyrianthin D (**6**) showed a 2-methylbutanoyl residue in unit A (δ_C 175.0) located at C-2 of the rhamnose unit (δ_H 5.54), and a tigloyl residue (δ_C 167.4) in unit B was located as the acylating group at positions C-4 (δ_H 4.26) of the terminal quinovose unit. For tyrianthin E (**7**), a 2-methylbutanoyl residue in unit A (δ_C 175.0) was located at C-2 of the rhamnose unit (δ_H 5.54), a niloyl residue (δ_C 175.2) in unit A was located at C-6 (δ_H 4.23) of the glucose unit, and a tigloyl residue (δ_C 167.4) in unit B was located as the acylating group at positions C-4 (δ_H 4.26) of the terminal quinovose unit. Compounds **5–7** are ester-type heterodimers with chemical structures very similar to those of tyrianthins A and B previously reported [9].

The negative and positive-ion FABMS of tyrianthinic acid VI (**8**) showed the quasimolecular ion peak at m/z 971 $[M-H]^-$ and the adduct ion $[M + Na]^+$ at m/z 995, consistent with the molecular formula $C_{45}H_{80}O_{22}$. The negative-ion FABMS showed other peaks at m/z 871 $[m/z$ 971–100 ($C_5H_8O_2$)] $^-$ representing the loss of a niloyl residue. The glycosidic cleavage of the sugar moieties yielded peaks at m/z 725 $[m/z$ 871–146] $^-$, 579 $[m/z$ 725–146] $^-$, 417 $[m/z$ 579–162] $^-$, and 271 $[m/z$ 417–146] $^-$.

The 1H -, ^{13}C -, and HSQC NMR spectra of compound **8** allowed the identification of four anomeric signals δ_H 4.30–5.39 and δ_C 101–106. Three doublet signals were observed between δ_H 1.1 and 1.2, which confirmed the presence of three methylpentose units in compound **8**. All protons of each saccharide unit were sequentially assigned by a combination of COSY and TOCSY NMR techniques, and all carbons were assigned by the HSQC NMR spectrum. These procedures allowed the identification of one glucopyranosyl, two quinovopyranosyl, and one rhamnopyranosyl units in compound **8**. The anomeric configurations for the sugar moieties were assigned as β for glucopyranosyl and quinovopyranosyl and α for rhamnopyranosyl. The interglycosidic connectivities were confirmed by HMBC experiment: H-2 of quinovose and C-1 of glucose, H-2 of glucose and C-1 of rhamnose, and H-4 of rhamnose and C-1 of terminal quinovose, in accordance with the nature of its glycosidic acid. The triplet signal at 2.27 ppm for the methylene protons at C-2 of the aglycon unit and the absence of correlations between $^{13}C=O$ of aglycon and protons of sugar units in the HMBC spectrum confirmed the acyclic molecular structure proposed for tyrianthinic acid VI (**8**). These studies were also able to determine that a niloyl group is bonded to C-4 of Qui'. The position of the 11-hydroxyhexadecanoic acid (aglycon) moiety in the oligosaccharide was determined by the correlation between aglycon H-11 and H-1 of internal

quinovose in a 2D-NMR ROESY spectrum. Compound **8** has a chemical structure similar to those reported for tyrianthinic acids I and II [8].

All mice pretreated with diazepam (DZP, 1.0 mg/kg) had no convulsions after pentylenetetrazole (PTZ) injection ($p < 0.05$) and none of them died. Pretreatment with compounds **5–7** (80.0 mg/kg) induced a protection of 31.2, 28.3, and 26.9 %, respectively, against mortality induced by PTZ. Pretreatment with compounds **5–7** could not protect animals against seizure induced by PTZ, compared to the positive control group. Compounds **1, 2, 3, 4**, and **6** did not show any protection against seizures and death induced by PTZ. The effects of compounds **5–7** against seizures induced by PTZ were similar to those reported for the convolvulin of *I. tyrianthina* [14].

The administration of 20, 40, and 80 mg/kg of compounds **5–7** caused an increase in the latency and duration of sleeping time induced by administration of sodium pentobarbital (30 mg/kg), respect to the control group (Fig. 1), but compounds **1, 2, 3, 4**, and **6** did not produce any effect. The data obtained with compounds **5–7** are similar to those reported for tetrasaccharide glycolipids of *I. tyrianthina* [14] and *I. stans* [20] indicating the sedative effect of these resin glycosides. This action is associated with a depression of the central nervous system (CNS) [18]. Sodium pentobarbital is a barbiturate that induces sleep in both rodents and humans, and this test is a classic method used to screen sedative–hypnotic drugs. Substances that enhance the effect of pentobarbital can be considered as sedative [19]. The present study demonstrates the sedative effect of heterodimers (**5–7**) isolated from the convolvulin of *I. tyrianthina*.

Compounds **5–7** (10 μ g/mL) were added to mouse brain slices, inducing a release of GABA up to ca. 0.25 pmol/ μ g protein at 120 s, but compounds **1, 2, 3, 4**, and **6** did not produce any effect. Compound **5** induced a higher release of GABA (0.45 pmol/mg) at time 300 s. This behavior is lower than that reported for other glycolipids of *I. tyrianthina*, which at a dose of 2.5 μ g/mL induced a continuous increase of

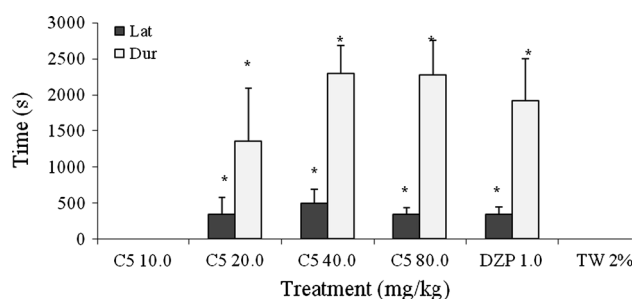


Fig. 1 Effect produced by different doses (20.0, 40.0, and 80.0 mg/kg, i.p.) of compound **5** (C5) on the latency and duration time of sodium pentobarbital-induced sleeping time (30.0 mg/kg, sub-hypnotic dose). The results are presented as means + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ as compared with the control group. (one-way ANOVA followed by Dunnett test); $n = 8$ mice per group. Lat latency, Dur duration, DZP Diazepam, TW 2.5 % Tween 20

GABA until 2 min, whereas at 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the maximum release of GABA was observed at 30 s and gradually diminished with time [8, 9]. Compounds 5–7 did not affect the release of glutamic acid, so the effect of these compounds seems to be specific for the GABA system.

Compounds 5–7 showed significant vasorelaxant effects on endothelium-intact (E+) aortic rings ($\text{IC}_{50} = 0.24 \pm 0.09 \mu\text{M}$ and $\text{E}_{\text{max}} = 81.80 \pm 0.90 \%$; $\text{IC}_{50} = 0.14 \pm 0.08 \mu\text{M}$ and $\text{E}_{\text{max}} = 87.68 \pm 0.72 \%$, $\text{IC}_{50} = 0.20 \pm 0.09 \mu\text{M}$ and $\text{E}_{\text{max}} = 78.80 \pm 0.90 \%$, respectively). When endothelium was removed (E-), the relaxant activity was abolished. Compounds 1, 2, 3, 4, and 6 did not produce any effect. These results indicated that compounds 5–7 produced significant vasodilator effects in concentration- and endothelium-dependent manners on isolated rat aortic ring [13]. Compounds 5–7 showed similar efficacy and potency to carbachol, the positive control (Fig. 2). Only at high concentration (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was the response poorly visualized in endothelium denuded aortic rings. Our result is similar to that reported for the convolvulin of *I. tyrianthina* and tricolorin A, which showed a concentration-dependent vasorelaxation of the isolated intact rat aorta [14, 15]. This vascular relaxation was endothelium-dependent and significantly decreased in the presence of nitric oxide synthase and a NO scavenger [16]. Compounds 5–7 seems to produce their vasorelaxant effect through endothelium-derived factors as nitric oxide synthase pathways. The vasoconstrictor effect showed by compounds 5–7 at higher concentrations could be related to endothelium contractile factors (ET-1, TXA2, vasopressin, and endoperoxides) [17].

In conclusion, compounds 2–8 are new glycolipids isolated from the root of *I. tyrianthina*. Tyrianthinic acids III (2), IV (3), and V (4) are the first pentasaccharide

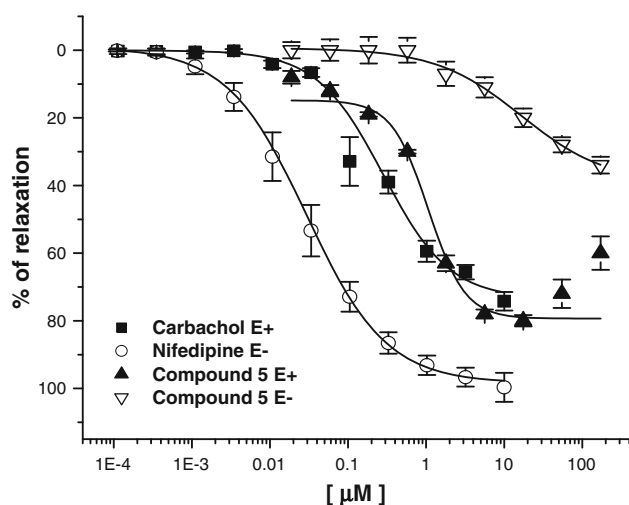


Fig. 2 Concentration–response curves showing the vasorelaxant effect of compound 5 on rat aortic rings pre-contracted with noradrenaline ($1 \times 10^{-7} \text{M}$). Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile responses calculated as the mean from six measurements \pm SE ($p < 0.05$)

glycosidic acids isolated from the root of *I. tyrianthina*. Compounds 5–7 partially protected animals against death induced by PTZ, caused an increase in the latency and duration of sleeping time induced by sodium pentobarbital, and increased the release of GABA from cortex tissue in mice in a time-dependent manner. In addition, the vasorelaxant activity of compounds 5–7 is concentration- and endothelium-dependent.

Experimental

General

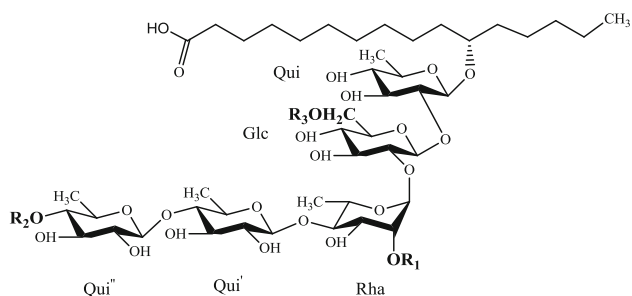
Melting points were determined on a Fisher–Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured using a Perkin Elmer 341 digital polarimeter. IR spectra were recorded using a Bruker model Vectra22. ^1H -, ^{13}C -, and 2D-NMR (COSY, TOCSY, HSQC, HSQC-TOCSY, and HMBC) experiments were obtained on a Varian Mercury 400 and Varian 700 spectrometer equipped with a 5-mm inverse detection pulse field gradient probe at 25 $^{\circ}\text{C}$. Proton and carbon chemical shifts were referenced to internal tetramethylsilane (TMS), with 20 mg of each glycolipid being dissolved in ca. 0.60 mL of methanol- d_4 . TOCSY spectra were obtained with different mixing times to facilitate the detection of all the signals for each individual monosaccharide unit. In addition, 2D-NMR data were processed with forward linear prediction and zero filling, in order to increase the resolution of each spectrum. Positive- and negative-ion FABMS were recorded using *m*-nitrobenzyl alcohol as matrix on a JEOL MStation JMS700 mass spectrometer. Mass spectra were acquired over the range 400–2300 Da. The GC–MS system consisted of an Agilent 6890 gas chromatograph and an Agilent 5970 mass selective detector in the electron-ionization mode. GC conditions: 25 m \times 0.2 mm HP-5 column (Hewlett Packard): He, 1 mL/min; 40 $^{\circ}\text{C}$ isothermal for 2 min, linear gradient to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, final temperature hold for 10 min; split 1:20; MS conditions: ionization energy 70 eV; ion source temperature 280 $^{\circ}\text{C}$; interface temperature 300 $^{\circ}\text{C}$; mass range 30–600 amu. HPLC was performed using a system comprising an Agilent 1100 binary pump, an Agilent variable-wavelength UV–vis 1100 detector, an Agilent refractive index 1100 detector, and a Rheodyne injector.

Plant material

Roots of *Ipomoea tyrianthina* were collected in the state of Morelos, Mexico (December 2004). Botanical classification was carried out by Biol. M. Castro, Facultad de Ciencias, UNAM, and a voucher specimen (number 15077) is deposited at the Instituto Mexicano del Seguro Social Herbarium in Mexico City.

Extraction and isolation of compounds 2–8

Dried and ground roots (100 g) of *Ipomoea tyrianthina* were extracted by maceration with hexane (400 mL \times 3) and CH_2Cl_2 (400 mL \times 3). The residual vegetal material was extracted with methanol (400 mL \times 3) at room temperature, to give a brown solid (20 g) after elimination of solvent by vacuum. The methanol-soluble extract (5 g) was extracted exhaustively with CH_2Cl_2 (20 mL \times 4) and later with H_2O (20 mL \times 4), yielding 4 g of an insoluble material. The solid was subjected to gravity column chromatography over reverse phase (C_{18}) silica gel (20 g) using gradients of CH_3OH in H_2O (0:100 to 100:0). A total of 20 fractions (20 mL each) were collected and combined to give several pools. Fractions 8–18 were combined, giving a yellow resinous material (3 g) after elimination of solvent. The yellow resin was subjected to separation using a column packed with activated charcoal (5 g) using CH_3OH 30 mL. A total of 6 fractions were collected and combined, obtaining 2 g of a white resinous solid after elimination of the solvent. The white resin was subjected to separation using a column packed with silica gel (20 g), using gradients of CH_3OH in CH_2Cl_2 (0:100 to 100:0), obtaining two chromatographic fractions. The components of the less polar chromatographic fraction (1.5 g) were purified by preparative HPLC using an Ultrasil ODS column (10 mm i.d. \times 300 mm, 5 μm , Altex), eluting with a mixture of CH_3CN - H_2O (7:3), at a flow rate of 1 mL/min at 25 $^\circ\text{C}$, and detection with UV at 215 nm. Chromatographic peaks were collected by the technique of heart cutting and independently re-injected in the apparatus until highest purity was achieved. This technique afforded pure compounds **8** (140 mg, t_{R} 15.5 min), **2** (100 mg, t_{R} 18.9 min), **3** (150 mg, t_{R} 22.4 min), **4** (140 mg, t_{R} 27.6 min), **5** (700 mg, t_{R} 37.5 min), **6** (100 mg, t_{R} 45.2 min), and **7** (140 mg, t_{R} 53.4 min).



		R ₁	R ₂	R ₃
Tyrianthinoic acid	(1)	H	H	H
Tyrianthinoic acid III	(2)	mba	niloyl	H
Tyrianthinoic acid IV	(3)	mba	H	niloyl
Tyrianthinoic acid V	(4)	mba	niloyl	niloyl

Tyrianthinoic acid (1). Amorphous powder; mp 146–148 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -15.1 (c 1.1 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1740 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Table 1; positive-ion FABMS m/z 1041 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1017 $[\text{M} - \text{H}]^-$, HRFABMS m/z 1041.5105 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{82}\text{NaO}_{24}$, requires 1041.5094).

Tyrianthinoic acid III (2). Amorphous powder; mp 146–148 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -22.0 (c 1.1 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Table 1; positive-ion FABMS m/z 1225 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1201 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 871, 579, 417, and 271; HRFABMS m/z 1225.6205 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{NaO}_{27}$, requires 1225.6193).

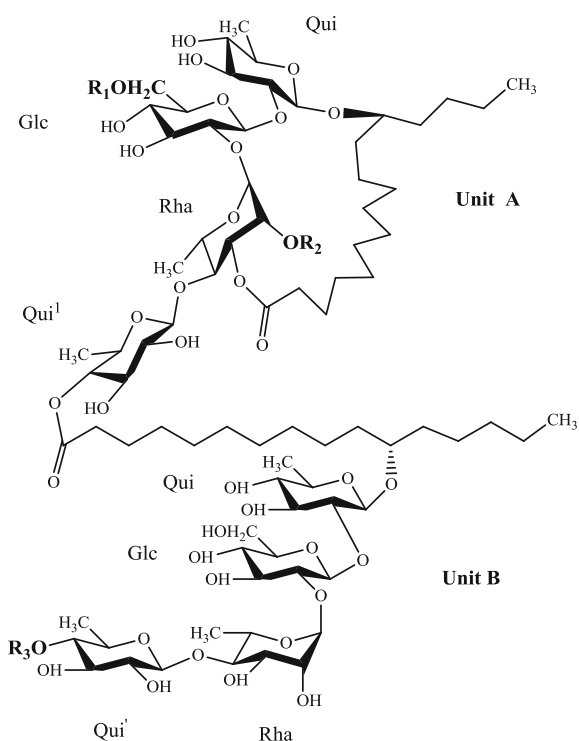
Tyrianthinoic acid IV (3). Amorphous powder; mp 167–169 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -23.8 (c 1.1 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Table 1; positive-ion FABMS m/z 1225 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1201 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 871, 579, 417, and 271; HRFABMS m/z 1225.6206 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{NaO}_{27}$, requires 1225.6193).

Tyrianthinoic acid V (4). Amorphous powder; mp 170–172 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -20.8 (c 1.7 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Table 1; positive-ion FABMS m/z 1325 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1301 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 871, 579, 417, and 271; HRFABMS m/z 1325.6740 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{61}\text{H}_{106}\text{NaO}_{29}$, requires 1325.6717).

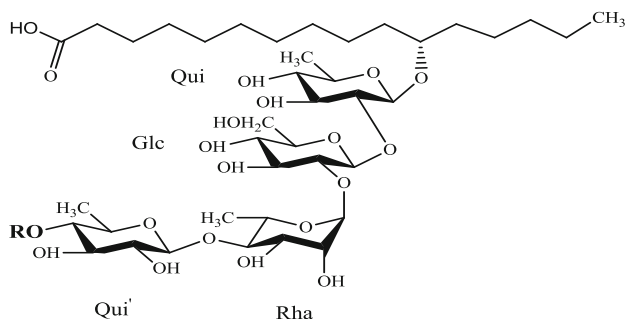
Tyrianthin C (5). Amorphous powder; mp 146–148 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -22.0 (c 1.1 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Tables 2 and 3; positive-ion FABMS m/z 1915 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1891 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1036 $[\text{M} - \text{unit B}]^-$, 936, 852, 705, 561, 417, and 271; HRFABMS m/z 1916.0035 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{156}\text{NaO}_{41}$, requires 1916.0020).

Tyrianthin D (6). Amorphous powder; mp 140–142 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -20.1 (c 1.3 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Tables 2 and 3; positive-ion FABMS m/z 1897 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1873 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 936 $[\text{M} - \text{unit B}]^-$, 852, 705, 561, 417, and 271; HRFABMS m/z 1897.9927 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{154}\text{NaO}_{40}$, requires 1897.9914).

Tyrianthin E (7). Amorphous powder; mp 137–139 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -19.9 (c 1.8 CH_3OH); IR ν_{max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm^{-1} ; ^1H - and ^{13}C -NMR, see Tables 2 and 3; positive-ion FABMS m/z 1997 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; negative-ion FABMS m/z 1973 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1036 $[\text{M} - \text{unit B}]^-$, 936, 852, 705, 561, 417, and 271; HRFABMS m/z 1998.0450 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{162}\text{NaO}_{42}$, requires 1998.0438).



	R ₁	R ₂	R ₃
Tyrianthin C (5)	niloyl	mba	H
Tyrianthin D (6)	H	mba	tigloyl
Tyrianthin E (7)	niloyl	mba	tigloyl



Tyrianthinoic acid VI (8) R = niloyl

Tyrianthinoic acid VI (8). Amorphous powder; mp 160–162 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -18.8 (c 1.4 CH₃OH); IR ν_{\max} 3376 (OH), 2985 (C–H), 1735 (C=O), 1450, 1370, 1200, 1090 cm⁻¹; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 4; positive-ion FABMS m/z 995 [M + Na]⁺; negative-ion FABMS m/z 971 [M–H][–], 871, 579, 417, and 271; HRFABMS m/z 995.5053 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₅H₈₀NaO₂₂, requires 995.5039).

Isolation of tyrianthinoic (1) and scammonic acids

Individual solutions of compounds 2–8 (20 mg) in 0.2 N NaOH (5 mL) were heated until reflux for 60 min. The reaction mixtures were acidified to pH 4 and extracted with CH₂Cl₂ (5 mL). The aqueous phase from each reaction was lyophilized, and the residue was extracted with *n*-butanol (5 mL), and concentrated to give a colorless solid (10 mg). Each residue was further analyzed by an HPLC system comprising an Agilent 1100 binary pump, an Agilent variable-wavelength UV–vis 1100 detector (210 nm), and a Rheodyne injector, using an Ultrasil ODS column (10 mm i.d. × 300 mm, 5 μm, Altex). The elution was isocratic with a mixture of CH₃CN and H₂O (8:2), at a flow rate of 1 mL/min at 25 °C. The eluting peaks were collected and reinjected until a single peak was observed in the chromatogram. This procedure showed that compounds 2–4 yielded tyrianthinoic acid (1) (t_R = 22.4 min), while compounds 5–8 yielded the same glycosidic acid (scammonic acid, t_R = 25.4 min), which was identified by comparison of physical constants and NMR data with published values [4].

Identification of aglycons

Individual solutions of compounds 2–8 (50 mg) in 2.0 N HCl (10 mL of water–ethanol) were heated until reflux for 2.0 h. The reaction mixtures were adjusted to pH 4 with NaOH solution, and the solutions were extracted with CH₂Cl₂ (2 × 5 mL). The organic solutions were washed with water, dried over Na₂SO₄, and analyzed by GC–MS, allowing the identification of the following acid derivatives: ethyl 2-methyl-2-butenolate (t_R = 5.8 min) m/z [M]⁺ 128 (5), [M–C₂H₄]⁺ 100 (24), [M–OC₂H₅]⁺ 83 (26), 55 (80), 27 (100); ethyl 2-methylbutanoate (t_R = 6.6 min) m/z [M]⁺ 130 (0.5), [M–C₂H₄]⁺ 102 (34), [M–OC₂H₅]⁺ 85 (26), 57 (80), 29 (100); ethyl 3-hydroxy-2-methylbutanoate (t_R = 8.65 min) m/z [M]⁺ 132 (5.0), [M–OC₂H₅]⁺ 87 (20), 73 (100), 45 (40); and ethyl 11-hydroxyhexadecanoate (t_R = 19.57 min) m/z [CH₃–(CH₂)₄–CH–(OH)–(CH₂)₉CO₂ C₂H₅]⁺ 300 (1), [CH₃–(CH₂)₄–CH–(OH)–(CH₂)₉CO]⁺ 255 (3.0), [(CH₂)₉CO₂ C₂H₅]⁺ 199 (50), [CH₃–(CH₂)₄–CH–OH]⁺ 101 (60), 83 (45), 57 (100), 73 (20), 45 (40). Another aliquot of the dichloromethane solution was submitted to normal phase column chromatography, using gradients of CH₃OH in CH₂Cl₂ (0:100 to 95:5), to give 4 mg of ethyl 11-hydroxyhexadecanoate, which was identified by comparison of the ¹H- and ¹³C-NMR and GC–MS data with those reported in the literature [11]. The absolute configuration of the jalapinolic acid was determined by comparison of the observed optical rotation $[\alpha]_D^{25}$ $+0.42^\circ$ with the value ($[\alpha]_D^{25}$ $+0.45^\circ$) of

Table 1 NMR spectral data of compounds **1**, **2**, **3**, and **4** (CD₃OD, δ ppm, J in Hz)

Position	1		2		3		4	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
Qui								
1	4.30 d (7.6)	102.1	4.32 d (7.6)	102.0	4.32 d (7.6)	103.1	4.23 d (7.6)	101.4
2	3.58*	79.0	3.56 dd (9.0, 7.6)	79.0	3.52 dd (9.0, 7.6)	79.4	3.55 dd (9.0, 7.6)	80.4
3	3.63 dd (9.0, 9.0)	78.7	3.63 dd (9.0, 9.0)	78.7	3.30 dd (9.0, 9.0)	78.3	3.28 dd (9.0, 9.0)	78.3
4	2.98 dd (9.0, 9.0)	77.4	2.98 dd (9.0, 9.0)	77.4	2.94 dd (8.9, 9.0)	77.7	2.95 dd (8.9, 9.0)	77.4
5	3.27 dd (9.0, 7.0)	72.8	3.27 dd (9.0, 7.0)	72.8	3.33 dd (8.9, 7.0)	72.3	3.28 dd (9.0, 7.0)	71.8
6	1.16 d (7.0)	18.0	1.16 d (7.0)	18.0	1.17 d (7.0)	17.4	1.14 d (7.0)	17.6
Glc								
1	4.92 db (7.7)	97.9	4.30 d (7.7)	97.2	4.85 d (7.7)	98.2	4.81 d (7.6)	97.3
2	3.39 dd (9.1, 7.7)	77.8	3.39 dd (9.1, 7.7)	77.8	3.45 dd (9.1, 7.7)	78.0	3.43 dd (9.1, 7.5)	78.0
3	3.53 dd (9.0, 9.1)	79.2	3.49*	79.2	3.60*	78.8	3.60 dd (9.0, 9.1)	78.8
4	3.13 dd (9.0, 9.0)	72.4	3.13 dd (9.0, 9.0)	72.4	3.26 dd (9.0, 9.0)	72.1	3.24 dd (9.0, 9.0)	72.1
5	3.21 dd (9.0, 6.5)	77.8	3.21 dd (9.0, 6.5)	77.8	3.50 dd (9.0, 6.5)	70.3	3.51 dd (9.0, 6.5)	69.8
6	3.55 dd (9.0, 6.5)	63.5	3.55 dd (9.0, 6.5)	63.5	4.25 dd (10.0, 6.5)	63.7	4.25 dd (10.0, 6.5)	63.1
6a	3.85 dd (9.0, 3.3)		3.85 dd (9.0, 3.3)		4.40 dd (10.0, 3.5)		4.40 dd (10.5, 3.5)	
Rha								
1	5.32 d (1.4)	100.2	5.16 d (1.4)	100.2	5.10 d (1.4)	101.9	5.11 d (1.8)	100.2
2	3.92 b	72.0	5.10 b	72.0	5.10 b	72.0	5.10 dd (3.3, 1.8)	71.8
3	4.02 dd (9.3, 3.2)	71.9	3.52 dd (9.3, 3.2)	71.9	3.50 dd (9.3, 3.2)	72.2	3.50 dd (9.3, 3.3)	72.1
4	3.57 dd (9.0, 9.3)	83.3	3.58 dd (9.0, 9.3)	83.3	3.58 dd (9.3, 9.0)	83.8	3.57 dd (9.0, 9.3)	83.1
5	3.31 dd (9.0, 6.5)	68.0	3.40 dd (9.0, 6.5)	68.0	3.40 dd (9.0, 6.5)	68.2	3.31 dd (9.0, 6.5)	69.8
6	1.18 d (6.5)	18.2	1.18 d (6.5)	18.2	1.22 d (6.5)	18.3	1.31 d (6.5)	18.3
Qui'								
1	4.67 d (7.6)	104.0	4.38 d (7.6)	102.1	4.36 d (7.6)	103.1	4.53 d (7.8)	103.7
2	3.17 dd (9.0, 7.6)	79.1	3.19 dd (9.0, 7.6)	79.1	3.17 dd (9.0, 7.6)	76.4	3.20 dd (9.0, 7.8)	76.1
3	3.34 dd (9.0, 9.0)	73.4	3.34 dd (9.0, 9.0)	73.4	3.45 dd (9.0, 9.0)	75.5	3.48 dd (9.0, 9.0)	75.4
4	3.99 dd (9.1, 9.0)	74.0	3.99 dd (9.1, 9.0)	74.0	3.95 dd (9.1, 9.0)	74.0	3.92 dd (9.0, 9.0)	74.5
5	3.28 dd (9.1, 6.4)	70.0	3.28 dd (9.1, 6.4)	70.0	3.20 dd (9.1, 6.4)	70.0	3.20 dd (9.1, 6.4)	70.0
6	1.14 d (6.4)	18.3	1.14 d (6.4)	18.3	1.18 d (6.4)	18.3	1.17 d (6.4)	18.3
Qui''								
1	5.22 d (7.6)	101.9	4.58 d (7.2)	103.1	4.60 d (7.6)	105.0	4.53 d (7.6)	103.7
2	3.19 dd (9.0, 7.6)	79.1	3.19 dd (9.0, 7.2)	79.1	3.17 dd (9.0, 7.6)	76.2	3.10 dd (9.0, 7.6)	76.7
3	3.34 dd (9.0, 9.0)	73.4	3.34 dd (9.0, 9.0)	73.4	3.35 dd (9.0, 9.0)	75.8	3.31 dd (9.0, 9.0)	75.2
4	2.98 dd (9.0, 9.0)	72.6	4.50 dd (9.0, 9.0)	78.6	2.95 dd (9.0, 9.0)	76.3	4.56 dd (9.0, 9.0)	78.6
5	3.20 dd (9.0, 6.9)	70.0	3.20 dd (9.0, 6.9)	70.0	3.25 dd (9.0, 7.0)	70.3	3.20 dd (9.0, 6.5)	70.0
6	1.12 d (6.9)	18.3	1.12 d (6.9)	18.3	1.18 d (7.0)	17.0	1.24 d (6.5)	18.5
Jal								
1		180.9		173.9		173.6		173.6
2	2.27 t (7.4)	33.2	2.27 t (7.4)	33.2	2.26 t (7.5)	33.6	2.27 t (7.5)	33.2
11	3.56*	77.3	3.56*	77.3	3.55*	77.3	3.56*	77.3
16	0.92 t (7.1)	14.3	0.92 t (7.0)	14.3	0.91 t (7.0)	13.0	0.92 t (7.5)	14.3
Mba								
1				175.1		175.2		175.3
2			2.46 tq (7.0, 7.0)	41.6	2.46 tq (7.0, 7.0)	41.6	2.40 (7.0, 7.1)	41.8
2-Me			1.18 d (7.0)	17.8	1.18 d (7.1)	17.2	1.11 (7.0)	17.0
3			1.70, 1.55*	27.4	1.65, 1.53*	27.5	1.66, 1.44*	27.2
4			0.99 t (7.0)	12.0	0.99 t (7.1)	12.0	0.95 t (7.0)	11.9

Table 1 continued

Position	1		2		3		4	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
Nil								
1				175.8		175.9		175.8
2			2.45 dq (7.1, 7.1)	47.5	2.46 dq (7.0, 7.0)	47.4	2.44 dq (7.0, 7.0)	47.4
2-Me			1.14 d (7.1)	20.7	1.15 d (7.0)	20.6	1.15 d (7.0)	20.4
3			3.91*	69.2	3.90*	69.1	3.91*	69.1
4			1.11 d (7.0)	13.4	1.12 d (7.0)	13.4	1.11 d (7.0)	13.4
Nil'								
1								175.7
2							2.43 dq (7.0, 7.0)	47.4
2-Me							1.15 d (7.0)	20.4
3							3.91*	69.3

Qui quinovopyranosyl, *Glc* glucopyranosyl, *Rha* rhamnopyranosyl, *Jal* 11-hydroxyhexadecanoyl, *Nil* 3-hydroxy-2-methylbutanoyl, *Mba* 2-methylbutanoyl. Chemical shifts marked with asterisk (*) indicate overlapped signals

an authentic sample of the *S* enantiomer of ethyl ester of jalapinic acid.

Carbohydrate analysis

The aqueous phase was neutralized with 1 N Na_2CO_3 solution and lyophilized to give a colorless powder. The residue was dissolved in CH_3OH and analyzed by an HPLC system comprising an Agilent 1100 binary pump, an Agilent 1100 refractive index detector, and a Rheodyne injector, using an Alltech Nucleosil 100 NH_2 column (5 μm , 250 \times 4.6 mm), with isocratic elution of CH_3CN – H_2O (8:2), at a flow rate of 1 mL/min, and a sample injection of 200 μL (sample concentration 10 mg/mL). Three monosaccharides were identified by co-elution with standard rhamnose ($t_{\text{R}} = 7.9$ min), quinovose ($t_{\text{R}} = 8.9$ min), and glucose ($t_{\text{R}} = 15.2$ min). Each of these eluates was individually collected, concentrated, and dissolved in water for optical activity analysis, allowing the determination of the configurations D-glucose [$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +48.9$ ($c = 1.8 \text{ H}_2\text{O}$)], D-quinovose [$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +32.6$ ($c = 2.8 \text{ H}_2\text{O}$)], and L-rhamnose [$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +9.9$ ($c = 1.5 \text{ H}_2\text{O}$)].

Animals

Albino male ICR mice weighing 30–36 g and male Wistar rats weighing 250–300 g were used (Harlan, Mexico City). All animals were housed 8 per cage, maintained under laboratory conditions at 25 °C, 12 h light/12 h dark cycle, with lights turned on at 07:00 a.m., and free access to water and standard food pellets (Harlan). Mice were allowed at least 3 weeks to adapt to the laboratory environment before

experiments. Experiments for determination of activity on CNS were carried out between 8:00 a.m. and 12:00 p.m. in an adjacent special noise-free room with controlled illumination. All experimental procedures were carried out according to a protocol approved by the Institutional Research Committee in compliance with the official Mexican norm (NOM-062-ZOO-1999). The minimum number of animals and duration of observation required to obtain consistent data were employed.

Anticonvulsant activity

Mice were divided into three groups. Group A was treated with 10, 20, 40, and 80 mg/kg i.p. of compounds **1–8** dissolved in 2.5 % Tween solution; Group B received diazepam dissolved in 2.5 % Tween solution (1.0 mg/kg, i.p.) as positive control; Group C served as the control and received the vehicle 2.5 % Tween 20 solution (100 μL /10 g) i.p. Animals were pretreated with compounds **1–8**, vehicle, or diazepam. Thirty minutes later, pentylenetetrazole was administered intraperitoneally (75 mg/kg), following which mice were placed separately into transparent Plexiglas cages (25 \times 15 \times 10 cm) and observed for 30 min for the occurrence of seizures. The time taken before the onset of clonic convulsions and the percentage of mortality protection were recorded [18].

Sodium pentobarbital-induced sleeping time

Mice were divided into three groups: Group A was treated with 10, 20, 40, and 80 mg/kg i.p. of compounds **1–8** dissolved in 2.5 % Tween solution; Group B received diazepam dissolved in 2.5 % Tween solution (1.0 mg/kg,

Table 2 ¹H-NMR data for compounds **5**, **6**, and **7** (CD₃OD, δ ppm, *J* in Hz)

	5		6		7	
	Unit A δ _H (J in Hz)	Unit B δ _H (J in Hz)	Unit A δ _H (J in Hz)	Unit B δ _H (J in Hz)	Unit A δ _H (J in Hz)	Unit B δ _H (J in Hz)
Qui						
1	4.38 d (7.6)	4.39 d (7.6)	4.40 d (7.6)	4.39 d (7.6)	4.40 d (7.6)	4.39 d (7.6)
2	3.52 dd (9.0, 7.6)	3.52 dd (9.0, 7.6)	3.55 dd (9.0, 7.6)	3.53 dd (9.0, 7.6)	3.55 dd (9.0, 7.6)	3.55 dd (9.0, 7.6)
3	3.30 dd (9.0, 9.0)	3.30 dd (9.0, 9.0)	3.28 dd (9.0, 9.0)	3.28 dd (9.0, 9.0)	3.27 dd (9.0, 9.0)	3.24 dd (9.0, 9.0)
4	2.94 dd (9.1, 9.0)	2.94 dd (9.1, 9.0)	2.95 dd (9.1, 9.0)	2.95 dd (8.9, 9.0)	2.94 dd (8.9, 9.0)	2.94 dd (8.9, 9.0)
5	3.33 dd (9.1, 7.0)	3.33 dd (9.1, 7.0)	3.30 dd (9.1, 7.0)	3.31 dd (9.1, 7.0)	3.31 dd (9.1, 7.0)	3.26 dd (9.1, 7.0)
6	1.17 d (7.0)	1.17 d (7.0)	1.17 d (7.0)	1.17 d (7.0)	1.17 d (7.0)	1.17 d (7.0)
Glc						
1	4.99 d (7.7)	5.00 d (7.4)	5.01 d (7.7)	5.02 d (7.4)	4.99 d (7.7)	5.00 d (7.4)
2	3.45 dd (9.1, 7.7)	3.43 dd (9.0, 7.4)	3.43 dd (9.1, 7.7)	3.44 dd (9.1, 7.0)	3.42 dd (9.1, 7.7)	3.45 dd (9.0, 7.4)
3	3.59*	3.58*	3.58*	3.59*	3.58*	3.59*
4	3.26 dd (9.0, 9.0)	3.15 dd (9.0, 9.0)	3.24 dd (9.0, 9.0)	3.14 dd (9.0, 9.0)	3.24 dd (9.0, 9.0)	3.35 dd (9.0, 9.0)
5	3.50 dd (9.0, 6.5)	3.27 dd (9.0, 6.5)	3.51 dd (9.0, 6.5)	3.25 dd (9.0, 6.5)	3.48 dd (9.0, 6.5)	3.47 dd (9.0, 6.5)
6	4.16 dd (11.3, 3.0)	3.59 dd (11.5, 3.5)	3.54 dd (11.5, 3.5)	3.58 dd (11.5, 3.0)	4.23 dd (11.5, 3.5)	3.56 dd (11.5, 3.5)
6'	4.40 dd (11.3, 6.0)	3.75 dd (11.5, 6.5)	3.82 dd (11.5, 6.5)	3.80 dd (11.5, 6.5)	4.39 dd (11.5, 6.5)	3.80 dd (11.5, 6.5)
Rha						
1	5.47 d (1.4)	5.48 d (1.5)	5.49 d (1.4)	5.49 d (1.5)	5.45 d (1.4)	5.45 d (1.5)
2	5.54 dd (3.0, 1.4)	3.90 dd (3.0, 1.5)	5.54 dd (3.2, 1.4)	3.91 dd (3.5, 1.5)	5.54 dd (3.2, 1.4)	3.90 dd (3.0, 1.5)
3	5.58 dd (9.3, 3.2)	3.96 dd (9.5, 3.0)	5.58 dd (9.3, 3.2)	3.97 dd (9.0, 3.5)	5.58 dd (9.3, 3.2)	3.98 dd (9.5, 3.0)
4	3.58 *	3.57 *	3.57 *	3.57 *	3.56 *	3.57 *
5	4.26 dd (9.0, 6.5)	4.24 dd (9.0, 6.0)	4.25 dd (9.0, 6.5)	4.23 dd (9.0, 6.5)	4.22 dd (9.0, 6.5)	4.23 dd (9.0, 6.0)
6	1.22 d (6.5)	1.31 d (6.2)	1.21 d (6.5)	1.30 d (6.2)	1.23 d (6.5)	1.31 d (6.2)
Qui'						
1	4.38 d (7.6)	4.39 d (7.6)	4.40 d (7.6)	4.39 d (7.6)	4.40 d (7.6)	4.39 d (7.6)
2	3.17 dd (9.0, 7.6)	3.17 dd (9.0, 7.6)	3.15 dd (9.0, 7.6)	3.10 dd (9.0, 7.6)	3.24 dd (9.0, 7.6)	3.24 dd (9.0, 7.6)
3	3.45 dd (9.0, 9.0)	3.35 dd (9.0, 9.0)	3.48 dd (9.0, 9.0)	3.31 dd (9.0, 9.0)	3.51 dd (9.0, 9.0)	3.37 dd (9.0, 9.0)
4	4.26 dd (9.1, 9.0)	3.55*	4.26 dd (9.1, 9.0)	4.26 dd (9.1, 9.0)	4.26 dd (9.1, 9.0)	4.26 dd (9.1, 9.0)
5	3.20 dd (6.4, 9.1)	3.45 dd (9.1, 6.4)	3.20 dd (9.1, 6.4)	3.40 dd (9.1, 6.4)	3.50 dd (9.1, 6.4)	3.45 dd (9.1, 6.4)
6	1.18 d (6.4)	1.18 d (6.4)	1.18 d (6.4)	1.18 d (6.4)	1.18 d (6.4)	1.18 d (6.4)
Jal						
2a,b	2.26, 2.47 m	2.28*	2.26, 2.47 m	2.28*	2.26, 2.47 m	2.28*
11	3.55*	3.55*	3.55*	3.55*	3.55*	3.55*
16	0.90 t (7.0)	0.89 t (7.0)	0.90 t (7.0)	0.89 t (7.0)	0.90 t (7.0)	0.89 t (7.0)
Mba						
2	2.46*		2.47*		2.46*	
2-Me	1.18 d (7.0)		1.17 d (7.0)		1.17 d (7.0)	
3	1.55, 1.70*		1.55, 1.70*		1.55, 1.70*	
4	0.90 dd (7.5, 7.5)		0.90 dd (7.5, 7.5)		0.90 dd (7.5, 7.5)	
Nil						
2	2.46*				2.47*	
2-Me	1.14 d (7.0)				1.14 d (7.0)	
3	3.90*				3.90*	
4	1.10 d (7.0)				1.10 d (7.0)	
Tig						
2-Me				1.72 d (7.0)		1.72 d (7.0)
3				6.90 q (7.0)		6.90 q (7.0)
4				1.79 d (7.0)		1.79 d (7.0)

Qui quinovopyranosyl, *Glc* glucopyranosyl, *Rha* rhamnopyranosyl, *Jal* 11-hydroxyhexadecanoyl, *Mba* 2-methylbutanoyl, *Nil* 3-hydroxy-2-methylbutanoyl, *Tig* 2-methyl-2-butenoyl. Chemical shifts marked with asterisk (*) indicate overlapped signals

Table 3 ^{13}C -NMR data for compounds **5**, **6**, and **7** (CD_3OD , δ ppm)

	5		6		7	
	Unit A δ_{C} , mult	Unit B δ_{C} , mult	Unit A δ_{C} , mult	Unit B δ_{C} , mult	Unit A δ_{C} , mult	Unit B δ_{C} , mult
Qui						
1	100.5	100.5	102.2	102.2	103.41	103.41
2	79.4	79.4	82.4	82.4	79.7	79.7
3	78.3	78.3	75.3	75.3	78.4	78.4
4	77.7	77.7	75.4	75.4	77.2	77.2
5	70.3	70.3	69.8	69.8	72.5	72.5
6	17.4	17.4	17.6	17.6	16.1	16.1
Glc						
1	100.1	100.1	102.3	102.3	101.6	101.6
2	78.0	78.0	78.0	78.0	79.0	79.0
3	78.8	78.8	78.8	78.8	78.0	78.0
4	72.1	72.1	72.1	72.1	69.8	69.8
5	70.3	70.3	69.8	69.8	76.7	76.7
6	63.4	63.4	63.4	63.4	63.4	62.4
Rha						
1	95.4	100.4	96.4	100.4	95.2	100.2
2	70.0	70.0	69.8	69.8	69.2	69.2
3	70.2	70.2	72.1	72.1	71.6	71.6
4	78.8	78.8	77.1	77.1	78.6	78.6
5	68.2	68.2	69.8	69.8	68.7	68.7
6	18.3	18.3	18.3	18.3	19.1	19.1
Qui'						
1	103.2	103.2	104.2	104.2	103.5	103.5
2	79.4	70.2	79.1	72.7	74.4	75.4
3	73.5	78.8	73.4	73.2	75.3	75.3
4	74.0	68.3	75.5	75.6	76.2	76.2
5	70.0	70.3	70.0	78.0	70.6	70.6
6	18.3	17.0	18.3	18.5	16.8	17.0
Jal						
1	173.6	173.6	173.7	173.7	173.7	173.7
2	35.4	35.4	35.4	35.4	35.4	35.3
11	79.3	79.4	79.3	79.3	79.3	79.3
16	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4
Mba						
1	175.0		175.0		175.0	
2	41.2		41.2		41.2	
2-Me	17.2		17.2		17.2	
3	26.5		26.5		26.5	
4	12.0		12.0		12.0	
Nil						
1	175.2				175.2	
2	48.7				48.6	
2-Me	20.7				20.8	
3	69.7				69.7	
4	13.4				13.3	
Tig						
1				167.4		167.4
2				128.1		128.1
2-Me				13.1		13.2
3				137.6		137.7
4				12.1		12.2

Qui quinovopyranosyl, Glc
glucopyranosyl, Rha
rhamnopyranosyl, Jal
11-hydroxyhexadecanoyl, Mba
2-methylbutanoyl, Nil 3-hydroxy-2-
methylbutanoyl, Tig 2-methyl-2-
butenoyl

Table 4 NMR spectral data of compound **8** (CD₃OD, δ ppm)

Position	8 δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
Qui		
1	4.30 d (7.6)	103.2
2	3.56*	79.7
3	3.63 dd (9.0, 9.0)	78.4
4	2.98 dd (9.0, 9.0)	76.2
5	3.27 dd (7.0, 9.0)	72.5
6	1.18 d (7.0)	18.6
Glc		
1	4.95 d (7.7)	101.9
2	3.39 dd (9.1, 7.7)	79.0
3	3.47 dd (9.0, 9.1)	78.0
4	3.10 dd (9.0, 9.0)	73.8
5	3.22 dd (9.0, 6.5)	76.7
6	3.58 dd (6.5, 9.0)	63.6
6*	3.87 dd (9.0, 3.3)	
Rha		
1	5.26 d (1.4)	101.2
2	3.92 b	69.2
3	4.02 dd (9.3, 3.2)	71.6
4	3.58 dd (9.0, 9.3)	78.6
5	4.31 dd (6.5, 9.0)	68.7
6	1.12 d (6.5)	18.1
Qui'		
1	4.58 d (7.6)	105.2
2	3.19 dd (9.0, 7.6)	74.4
3	3.45 dd (9.0, 9.1)	75.3
4	4.35 dd (9.1, 9.0)	76.2
5	3.38 dd (6.4, 9.1)	70.6
6	1.18 d (6.4)	18.3
Jal		
1		173.6
2	2.27 t (7.4)	35.4
11	3.56*	79.3
16	0.92 t (7.0)	14.5
Nil		
1		175.2
2	2.45 dq (7.0, 7.0)	48.5
2-Me	1.14 d (7.0)	20.7
3	3.92*	69.4
4	1.11 d (7.0)	13.8

Qui quinovopyranosyl, Glc glucopyranosyl, Rha rhamnopyranosyl, Jal 11-hydroxyhexadecanoyl, Nil 3-hydroxy-2-methylbutanoyl. Chemical shifts marked with asterisk (*) indicate overlapped signals

i.p.) as positive control; Group C served as the control and received the vehicle 2.5 % Tween 20 solution (100 μ L/10 g) i.p. Animals were pretreated with compounds **1–8**, vehicle, or diazepam. Thirty minutes later, sodium

pentobarbital was administered intraperitoneally (a sub-hypnotic dose, 30 mg/kg). The hypnotic effect was recorded as the time interval between disappearance (latency) and reappearance (duration) of the righting reflex [18].

GABA and glutamic acid release

Mice were killed by decapitation and the anterior brain cortex was dissected and slices (250–300 μ m) were cut manually using a razor blade and a cover glass guide. Brain slices were placed at 4 °C in 5 mL in a modified Krebs–Ringer medium (120.0 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 1.0 mM Tris–HCl buffer pH 7.4) and 10.0 mM glucose (pH 7.4) previously oxygenated with bubbling O₂. Amino-oxyacetic acid, 10.0 μ M, was added to the medium to prevent GABA metabolism. After 5 min, slices were placed in 5 mL of Krebs–Ringer medium at 37 °C for 10 min. No substance was added to the control group. Compounds **1–8** were added at a final concentration of 10.0 μ g/mL or 20 mg/mL. The positive control group was administered 47 mM KCl. Aliquots of 200 μ L were taken out at 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 3.0 min. At the end of the experiment, the content of GABA in each collected aliquot was determined by HPLC after derivatization with *O*-phthalaldehyde [21]. Protein content in brain slices was determined after its homogenization in 1 mL of water according to the Lowry method [22].

Vasorelaxant assay

Male Wistar rats (250–300 g) were killed by cervical dislocation. The thoracic aorta was cleaned of adhering connective tissue and was cut into rings 3–5 mm in length. In some rings, the endothelium was removed. Tissue segments were then mounted in stainless steel hooks, under an optimal tension of 3 g, in 10 mL organ baths containing warmed (37 °C) and oxygenated (O₂/CO₂, 19:1) Krebs solution (composition, mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; EDTA, 0.026, and glucose, 11.1, pH 7.4). Changes in tension were recorded by Grass-FT03 force transducers (Astromed, West Warwick, RI, USA) connected to a MP100 analyzer (Biopac Instruments, Santa Barbara, CA, USA). After equilibration, rings were contracted by noradrenaline (NA; 0.31 M) and washed every 30 min for 2 h. The absence of endothelium was confirmed by the lack of a relaxing response to carbachol (1 μ M). After pre-contraction with NA, the test samples (compounds **1–8**, vehicle, or positive control) were added to the bath in a volume of 100 μ L; cumulative concentration–response curves were then obtained for each ring. The relaxant effect of compounds **1–8** and positive controls was determined by comparing the muscular tone of the contraction before and after addition of the test compounds.

Acknowledgments This research was supported by CONACyT (Grants 90268 and CB2011-168569). J. M. Castro is grateful to CONACyT for a graduate student scholarship (43923). We thank LANEM (CIQ) for recording the NMR spectra. We also thank V. Labastida (CIQ, UAEM) for recording the FABMS, and M. Medina (CIQ, UAEM) for recording the GC-MS and IR spectra.

References

- Mannich C, Schumann P (1938) Über Jalapenharz und dessen Hauptbestandteil, das Convolvulin. Arch Pharm Ber Dtsch Pharm 276:211–213
- Díaz JL (1976) Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas II. IMEPLAM, México, p 329
- Argueta A, Cano L, Rodarte M (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista, México, p 233
- Mirón-López G, Herrera-Ruiz M, Estrada-Soto S, Aguirre-Crespo F, Vázquez-Navarrete L, León-Rivera I (2007) Resin glycosides from the roots of *Ipomoea tyrianthina* and their biological activity. J Nat Prod 70:557–562
- Pereda-Miranda R, Hernández-Carlos B (2002) HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from the Mexican scammony root. Tetrahedron 58:3145–3154
- Hernández-Carlos B, Bye R, Pereda-Miranda R (1999) Orizabins V-VIII. Tetrasaccharide glycolipids from Mexican scammony root. J Nat Prod 62:1096–1100
- Noda N, Ono M, Miyahara K, Kawasaki T, Okabe M (1987) Resin glycosides. I. Isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III and IV, genuine resin glycosides from root of *Ipomoea orizabensis*. Tetrahedron 43:3889–3902
- León-Rivera I, Mirón-López G, Molina-Salas GM, Herrera-Ruiz M, Estrada-Soto S, Gutiérrez MC, Alonso-Cortés D, Navarrete-Vázquez G, Ríos MY, Said-Fernández S (2008) Tyrianthinic acids from *Ipomoea tyrianthina* and their antimycobacterial activity. J Nat Prod 71:1686–1691
- León-Rivera I, Mirón-López G, Estrada-Soto S, Molina-Salas GM, Gutiérrez MC, Navarrete-Vázquez G, Hurtado G, Montiel E (2009) Glycolipid-ester type heterodimers from *Ipomoea tyrianthina* and their pharmacological activities. Bioorg Med Chem Lett 19:4652–4656
- León I, Mirón G, Alonso D (2006) Characterization of pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea arborescens*. J Nat Prod 69:896–899
- Enríquez RG, León I, Pérez F, Walls F, Carpenter KA, Puzzuolli FV, Reynolds WF (1992) Characterization, by two-dimensional NMR spectroscopy, of a complex tetrasaccharide glycoside isolated from *Ipomoea stans*. Can J Chem 70:1000–1008
- Noda N, Kogetsu H, Kawasaki T, Miyahara K (1990) Scammonins I and II. The Resin glycosides of radix scammonie from *Convolvulus scammonia*. Phytochemistry 29:3565–3569
- Avila-Villarreal G, Hernández-Abreu O, Hidalgo-Figueroa S, Navarrete-Vázquez G, Escalante-Erosa F, Peña-Rodríguez L, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S (2013) Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-A isolated from *Lonchocarpus xuul* Lundell by NO production: computational and ex vivo approaches. Phytomedicine 15:1241–1246
- León-Rivera I, Herrera-Ruiz M, Estrada-Soto S, Gutiérrez MC, Martínez-Duncker I, Navarrete-Vázquez G, Ríos MY, Aguilar B, Castillo-España P, Aguirre-Moreno A (2011) Sedative, vasorelaxant, and cytotoxic effects of convolvulin from *Ipomoea tyrianthina*. J Ethnopharmacol 135:434–439
- Hernández R, Vuelvas A, García A, Fragoso M, Pereda R, Ibarra C, Rojas A (2008) Calcium-dependent effect of tricolorin A on intestinal and arterial smooth muscle contractility. Planta Med 74:973–978
- Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S (2009) Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. Biochem Pharmacol 78:54–61
- Vanhoutte PMJ (2001) Endothelial adrenoceptors. Cardiovasc Pharmacol 38:796–808
- Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ (1996) Selection, preparation, and pharmacological evaluation of plant material, vol 1, chap 10. Wiley, New York, pp 168–169
- Koch-Weser J, Greenblatt T (1974) The archaic barbiturate hypnotics. New Engl J Med 291:790–791
- Herrera-Ruiz M, Gutiérrez C, Jiménez-Ferrer JE, Tortoriello J, Mirón G, León I (2007) Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from *Ipomoea stans* roots. J Ethnopharmacol 112:243–247
- Gutiérrez MC, Delgado-Coello BA (1989) Influence of pipercolic acid on the release and uptake of [³H]GABA from brain slices of mouse cerebral cortex. Neurochem Res 14:505–508
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275



Resin glycosides evoke the Gaba release by sodium- and/or calcium-dependent mechanism



José Manuel Castro-García^a, Ismael León-Rivera^b, María Del Carmen Gutiérrez^{a,*}

^a Laboratorio de Neurofarmacología, Centro de Investigación en Biotecnología, CEIB, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Tyrianthin A (PubChem CID: CHEMBL564587)

Scammonin 1 (PubChem CID: CHEMBL503387)

Tyrianthinic acid VI and Tyrianthin C (published by León-Rivera et al 2014)

Keywords:

Resin glycosides

Ipomoea tyrianthina

GABAergic transmission

ABSTRACT

Ipomoea tyrianthina Lindley (syn. *I. orizabensis* Pelletan, Lebed. ex Steud., Convolvulaceae) is known as a purgative, but it has been also used in Mexican traditional medicine in the treatment of seizures and pain for their anticonvulsive, hypnotic and sedative properties. Some glycolipids isolated from this plant have shown significant effects on Central Nervous System, modifying inhibitory or excitatory processes. The mechanism for such activity it is not clear; studies with these metabolites have suggested that a pore-forming mechanism is involved in their activity. Therefore, the present work explores a possible not pore-forming mechanism related to the effect of four resin glycosides, Scammonin 1 (S-1), tyrianthin C (T-C), tyrianthin A (T-A) and tyrianthinic acid VI (TA-VI), isolated from *Ipomoea tyrianthina* root on GABAergic transmission system in cerebral cortex slices of mouse brain in an in vitro model. The results obtained show that all glycolipids tested evoked endogenous GABA release and increased its concentration within the incubation medium compared with controls; T-C demonstrated a dose-dependent effect. Sodium absence and guvacine presence did not affect significantly the activity of S-1 and T-C in contrast to T-A and TA-VI. S-1 and T-C effects were calcium-dependent, where GABA concentrations were considerably reduced. These results suggest that the increase of endogenous γ -aminobutyric acid (GABA) released evoked by these glycolipids is possibly done through a Na^+ - and/or Ca^{2+} -dependent mechanisms, discarding a pore-forming mechanism.

1. Introduction

In the brain function, there is a balance between excitatory and inhibitory mechanisms, where a sudden imbalance might generate cell damage and lately large functional changes, resulting in several neurological diseases in humans. Currently, drugs used for treatments produce a variety of direct and indirect, or compensatory effects on any of the neurotransmitter systems [1], even with numerous adverse reactions (from minimal alterations on CNS to aplastic anemia and hepatic failure). On the other hand, secondary metabolites of medicinal plants could be eliminated easier than synthetic drugs, diminishing the side effects. In this context, the study of these metabolites represents an alternative for overcome adverse effects and will give us new insights in the development of new potential neuroactive drugs [2].

In Mexico, some species of *Ipomoea* genus have been used for the treatment of several diseases on CNS [3]. Herbal extracts, active

fractions, and pure compounds from this genus have been studied for their pharmacological properties [4–9].

Ipomoea tyrianthina Lindley (syn. *I. orizabensis* Pelletan, Lebed. ex Steud., Convolvulaceae) is a perennial twining herb with a large root. This root has been used in Mexican traditional medicine as a mild purgative, to treat seizures and sedative [10–12]. *Ipomoea tyrianthina* root is popularly known in Mexico as “escamonea” (mexican scammony) or locally named “*quebra platos*”, and it is available as dried root, crude resin, or alcoholic extract [7–10]. Previous reports have described the isolation and characterization of resin glycosides with different chemical structures (macrolactones, glycosidic acids, or dimers) [5–9,13–16].

The effect of these resin glycosides has been related with a pore-forming mechanism [17]. It has been described that intraperitoneal administration to mice of some pure glycolipids from *I. tyrianthina* showed activities associated to CNS (antidepressant, relaxing, hypnotic,

Abbreviations: TA-VI, tyrianthinic acid VI; T-A, tyrianthin A; T-C, tyrianthin C; S-1, scammonin 1; Na^+ , sodium; Ca^{2+} , calcium; TLC, thin layer chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; RP-HPLC, reverse phase HPLC

* Corresponding author.

E-mail address: carmengu@uaem.mx (M.D.C. Gutiérrez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioph.2017.10.089>

Received 28 June 2017; Received in revised form 12 October 2017; Accepted 18 October 2017
0753-3322/ © 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

sedative, anxiolytic, anticonvulsant and neuroprotective), and in *in vitro* assays, evoked endogenous GABA and glutamic acid release in brain cortex [5–9], however, the mechanism of such activity has not been studied.

Therefore, the aim of the present work was to explore the possible mechanism of four resin glycosides (*tyrianthinic acid VI*, *tyrianthin A*, *tyrianthin C* and *scammonin 1*) on the GABA release processes in cerebral cortex slices of mouse brain in an *in vitro* model.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Ipomoea tyrianthina root was collected in the state of Morelos (August 2005), and Mexico City (July 2004), Mexico. Botanical classification and identification was conducted by Biologist M. Castro, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Specimens were deposited in the Herbarium of Instituto Mexicano del Seguro Social (vouchers IMSS-15076 and IMSS-15075, respectively). The name of the plant was checked and confirmed according the official website www.theplantlist.org.

2.2. Resin glycosides

All resin glycosides (Fig. 1) used in this work were isolated from the jalapin and convolvulin of *Ipomoea tyrianthina* root.

The dried, powdered roots of *Ipomoea tyrianthina* (250.0 g) were extracted by maceration with CH_2Cl_2 (500 mL \times 3) and CH_3OH (500 mL \times 3), to obtain a solid dichloromethane-soluble extract (jalapin, 26 g) and 15 g of a dark syrup methanol-soluble extract. The jalapin was separated by column chromatography on Silica gel eluting with dichloromethane-methanol (9:1), yielded scammonin 1.

The methanol-soluble extract was washed with distilled water (3 \times 50 mL) and CH_2Cl_2 (3 \times 50 mL), to afford a dark solid (9.3 g). The solid (1.0 g) was submitted to a C18 column (Supelco, 10 \times 15 mm) with a gradient of $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (0:100 to 100:0, at increments of 10%/mL), fractions were collected and pooled. After elimination of the solvent, 0.7 g of a resinous material was obtained. The resinous solid was percolated on an activated charcoal column, eluting with CH_3OH . Fractions of 5 mL were collected and reunited giving the convolvulin (0.42 g). Tyrianthin A, tyrianthin C, and tyrianthinic acid VI were separated from the convolvulin and purified by reverse phase HPLC.

The chemical characterization of *T-A*, *TA-VI*, *S-1*, and *T-C* was performed by NMR and Mass spectrometry [5,7,9,14].

2.3. Animals

Twenty CD1 adult mice (20–30 g) were provided by the Animal Laboratory Unit of Instituto de Biotecnología, UNAM. Mice were kept under controlled conditions (12 light hours/12 dark hours at 25 °C, and free access to water and food). The ethical authorization for this research was obtained through the protocol approved by the Institutional Research Committee, conducting animal experiments in accordance with the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999).

2.4. Pharmacological evaluation

2.4.1. Cerebral cortex slices preparation

Mice were sacrificed by cervical dislocation and brain dissection was performed on a plate with crushed ice. Subsequently, cortex slices (250–300 μm) were manually obtained with a razor blade and guide coverslips according to Gutiérrez and Delgado-Coello. For each condition, a cerebral cortex slice (500–600 μg of protein) was placed in 2 ml of modified Krebs-Ringer buffer (basal medium): 118.0 mM NaCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.18 mM MgSO_4 ,

20.0 mM $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Trizma[®] base) and 5.6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, at a pH 7.4 and 4 °C in constant aeration. Aminooxyacetic acid (AOA) 10.0 μM was added to the medium to prevent GABA metabolism. Trizma[®] base and AOA were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the rest of the reagents were purchased from J. T. BAKER (Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México).

2.4.2. GABA release assays

In vitro GABA release assays were performed through an incubation system [18]. Cerebral cortex slices were placed into in vial with 2 ml of basal medium at 37 °C during 10 min with constant aeration. Thereafter, resin glycosides were added at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*T-A* and *TA-VI*) or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*T-A*, *TA-VI*, *S-1* and *T-C*). Aliquots of 200 μl were taken out at different times (0, 30, 60, 90, 120, 180 and 300 s) throughout the assay. To determine if the effect of resin glycosides on GABA release was sodium- or calcium-dependent, experiments were conducted in a similar manner as before replacing NaCl for 118.0 mM $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NOCl}$ (choline chloride) or by adding 100 μM EGTA instead of CaCl_2 . Moreover, the effect of resin glycosides on either GABA uptake process or the modulation of extracellular GABA concentration through GABA_B receptors was determined by adding at the test medium 100 μM guvacine hydrochloride (a GABA transport inhibitor), 100 μM β -alanine (a GABA transport inhibitor in glia), or 100 μM 2-hydroxy-saclofen (2-OH-S, selective GABA_B receptor antagonist). As positive control, incubation medium was modified increasing potassium up to 47.0 mM and diminishing sodium concentration (75.7 mM). Negative control was conducted in the presence of the basal medium. Aliquots were store at -20 °C for GABA measurement. Choline chloride, EGTA, guvacine hydrochloride, β -alanine and 2-hydroxy-saclofen were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.4.3. GABA quantification

GABA content of samples was determined by RP-HPLC in a Merck-Hitachi chromatograph equipped with a fluorescence detector (wavelength of 330 nm of excitation and 450 nm of emission), using a Cartridge-LiChrospher[®] 100 RP-C18 chromatographic column of 5 μm in particle size and a linear gradient of 80% solvent A (CH_3COONa 0.1 M, pH 7.0) to 100% solvent B (CH_3OH) in a running time of 10 min with a flow of 1.5 ml/min. 20 μl of each collected aliquot was previously derivatized with O-phthalaldehyde (OPA, Merck-Schuchardt), according to Jones and Gilligan. Quantification of GABA was achieved by using a standard curve of known concentrations of GABA (Sigma Aldrich) derivatized. A linear regression equation was used for the calculation of the concentration of GABA. Protein content in brain slices was determined after its homogenization in 1 ml of water according to the Lowry, using bovine serum albumin (BSA, Irvine Scientific) as protein calibration. GABA concentration in each aliquot was corrected for volume changes in the incubation medium and the data were expressed as pmol of GABA/ μg of protein. All solvents used in the chromatography protocol were HPLC grade and purchased from J. T. BAKER (Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México).

2.5. Statistical analysis

Data obtained from GABA release assays were analyzed using GraphPad Prism statistical platform (Prism 6 for Windows version 6.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) under ANOVA one tail and t-Student tests, ($p < 0.05$). All data were expressed as mean and standard error ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

3. Results

3.1. Effect of resin glycosides on endogenous GABA release

Resin glycosides *T-A*, *TA-VI*, *S-1* and *T-C* (10 or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

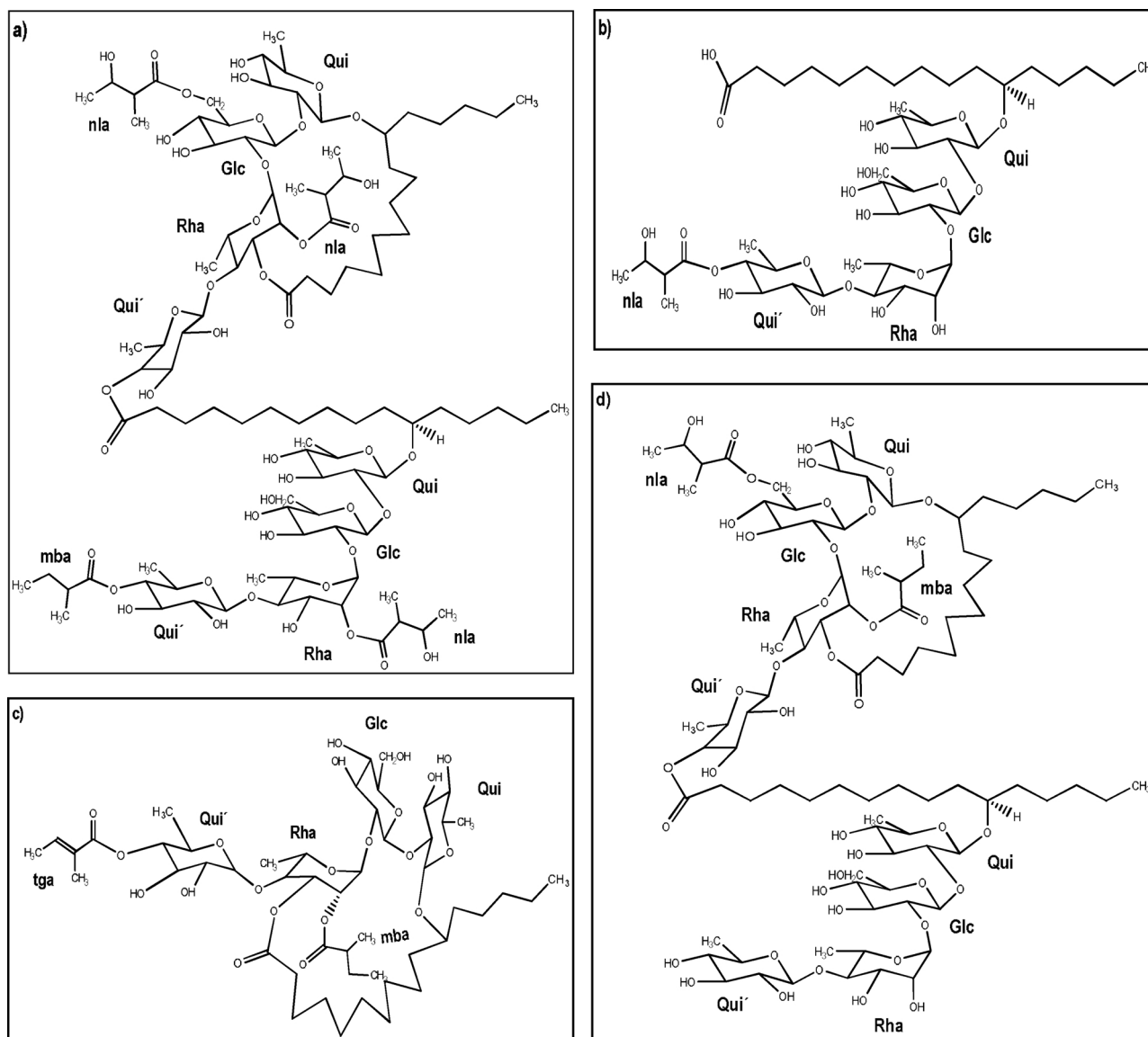


Fig. 1. Chemical structure of a) tyrianthin A (*T-A*), b) tyrianthinic acid (*TA-VI*), c) scammonin 1 (*S-I*) and d) tyrianthin C (*T-C*) isolated from *Ipomoea tyrianthina* root resin. Qui = quinose, Glc = glucose, Rha = rhamnose, nla = nilic acid, mba = 2-methylbutanoic acid and tga = tiglic acid.

increased significantly the release of GABA, showing all of them a similar behavior, with a maximum effect between 120 and 300 s (Fig. 2); the maximum values obtained were: 0.258 pmol/ μ g of protein (*T-A* 20 μ g/mL), 0.280 pmol/ μ g of protein (*TA-VI* 20 μ g/mL), 0.302 and 0.285 pmol/ μ g of protein (*S-I* 10 and 20 μ g/mL, respectively), and 0.275 and 0.133 pmol/ μ g of protein (*T-C* 10 and 20 μ g/mL, respectively). It is interesting to note that, in the case of *S-I* and *T-C*, GABA release was major at the lowest dose (10 μ g/mL).

Neurotransmitter release is both, sodium- and calcium-dependent. The aperture of Na^+ channels depolarizes the membrane and the neurotransmitter is released. Therefore, the GABA released induced by glycolipids was measured in the absence of external Na^+ . Resin glycosides *T-A* (20 μ g/mL) and *TA-VI* (20 μ g/mL) diminished significantly the GABA released: 41% (0.150 pmol/ μ g of protein) and 69% (0.088 pmol/ μ g of protein) respectively (Fig. 3a). Although with *S-I* (10 μ g/mL) the endogenous GABA released decreased 24%, this result was not statistically significant. In contrast, the release of GABA evoked by *T-C* (10 μ g/mL) was Na^+ -independent. With respect to calcium, the vesicular GABA released is generally thought to be calcium dependent. The addition of EGTA at the calcium-free basal medium diminished the GABA released evoked by all glycolipids (Fig. 3b). This effect was more

significant with *S-I* and *T-C* (both 89%) than with *T-A* and *TA-VI* (35% and 21%, respectively).

3.2. Effect of resin glycosides effect on GABAergic modulation

The GABA transport system and the GABA_B receptors are both involved in the extracellular concentration of GABA in the synaptic cleft. Once released, GABA is taken up into neuronal and glial cells by a high affinity uptake mechanism. Otherwise, the activation of GABA_B pre-synaptic receptors acts as auto-receptors, limiting transmitter release by reducing Ca^{2+} entry. Then, either the uptake inhibition or the GABA_B receptors blocked will give us an increase in the extracellular GABA concentration.

The addition of guvacine, a GABA-transporter inhibitor, at the *in vitro* assay caused an augment of GABA concentration to compare with *T-A* (0.824 pmol/ μ g of protein) and *TA-VI* (0.678 pmol/ μ g of protein) alone (Fig. 4a); representing an increase of 220% and 76% respectively. In contrast, with *S-I* and *T-C* assays, the presence of guvacine decreased the endogenous GABA released concentration to 0.203 pmol/ μ g of protein with *S-I* and 0.236 pmol/ μ g of protein with *T-C*, representing a diminishing of 33% and 14% respectively.

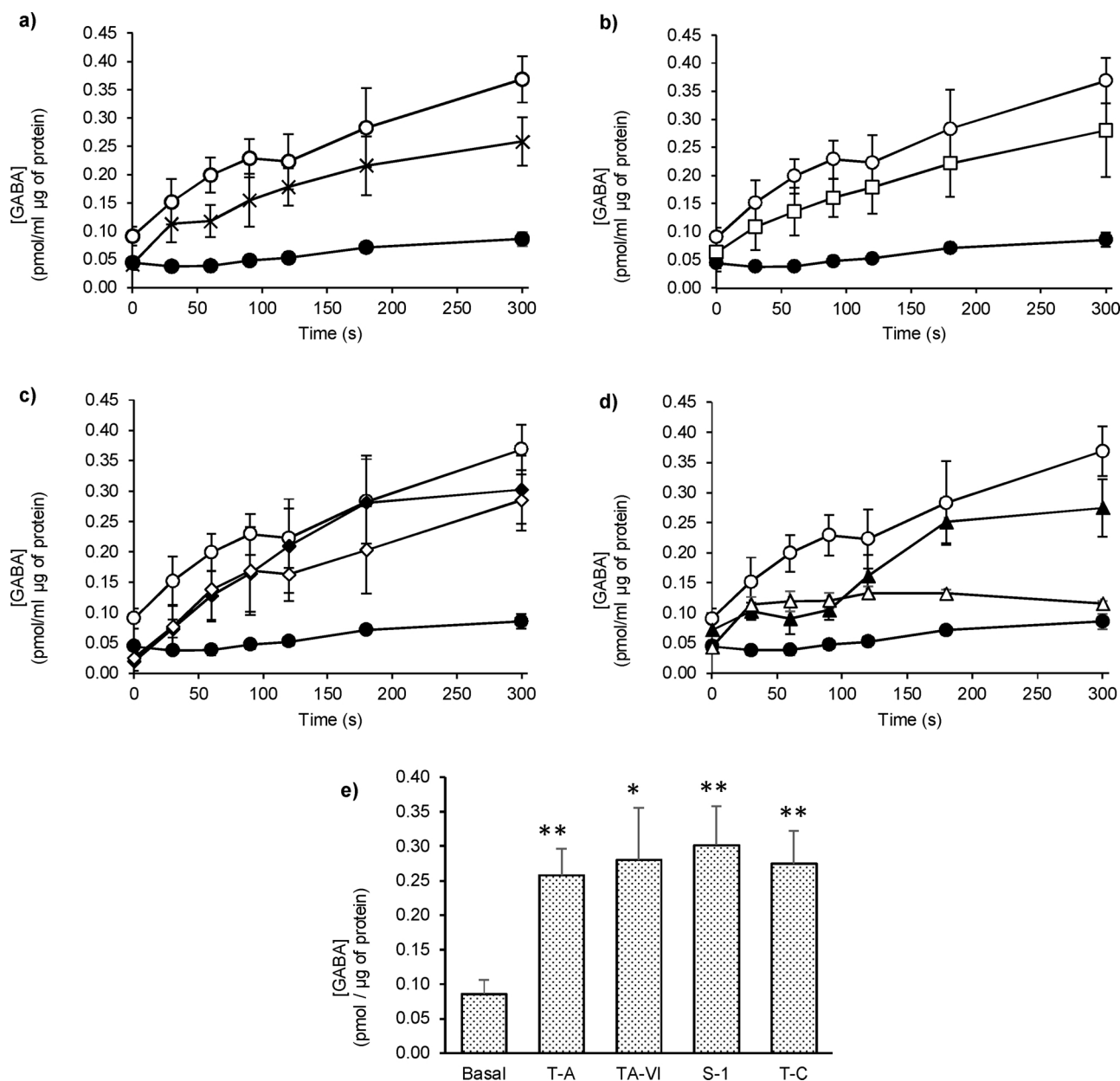


Fig. 2. Release of endogenous GABA in cerebral cortex slices evoked by a) *T-A* at 20 µg/mL (X) and 20 µg/mL (○); b) *TA-VI* at 20 µg/mL (□) and 20 µg/mL (○); c) *S-I* at 10 µg/mL (◆) and 20 µg/mL (◇); and d) *T-C* at 10 µg/mL (▲) and 20 µg/mL (△). Negative (●) and positive control (○) e) extracellular GABA concentration reached at the end of the assay. Values are means ± SEM of 5 independent experiments. ANOVA one tail and t-Student tests; *p < 0.05; **p < 0.01.

To assess an involvement of GABA_B receptors, we compared the effect of glycolipids in the presence of 2-OH-S. In these conditions, the amount of endogenous GABA released from cortical slices decreased slightly with *T-A* (Fig. 4b); however, with *S-I* and *T-C* a significant diminish of GABA concentration up to 45% (0.165 pmol/µg of protein) and 33% (0.184 pmol/µg of protein), respectively.

4. Discussion

The majority of secondary metabolites which possesses neuropharmacological activities have showed the ability of modifying neuronal excitability at different levels. Some of the processes affected are cell membrane integrity, excitation or inhibition processes or altering the function of some proteins (transporters, receptors and/or ionic channels) [2].

For glycolipids compounds, different mechanisms of action have been proposed (e.g., pore forming in the cellular membrane, interaction

with any receptor or activating intracellular signaling) [17,19]. Some authors emphasize that the size and amphipathic nature [20] of a particular glycolipid have to be considered in its pore forming capacity [17]. Our results indicate that glycolipids could affect nerve endings by enhancing basal release of endogenous GABA from cerebral brain slices; whereas the mechanism for such activity does not appear to be related to a pore forming capacity, since the release of others neurotransmitters or amino acids, such as alanine, glycine or aspartate is not observed (data not shown); this finding was also observed with convolvulin isolated from the root of *Ipomoea tyrianthina*, where a differential dose-dependent effect on the concentrations of GABA and glutamic acid was observed [8,16]. As well as many other glycolipids [8], *T-C* points to a biphasic dose response: the low dose showed a greater effect than the high dose.

The increase of extracellular GABA concentration may occur by several mechanisms: a) after membrane depolarization (Na⁺ influx through sodium channels), nerve endings can release GABA from

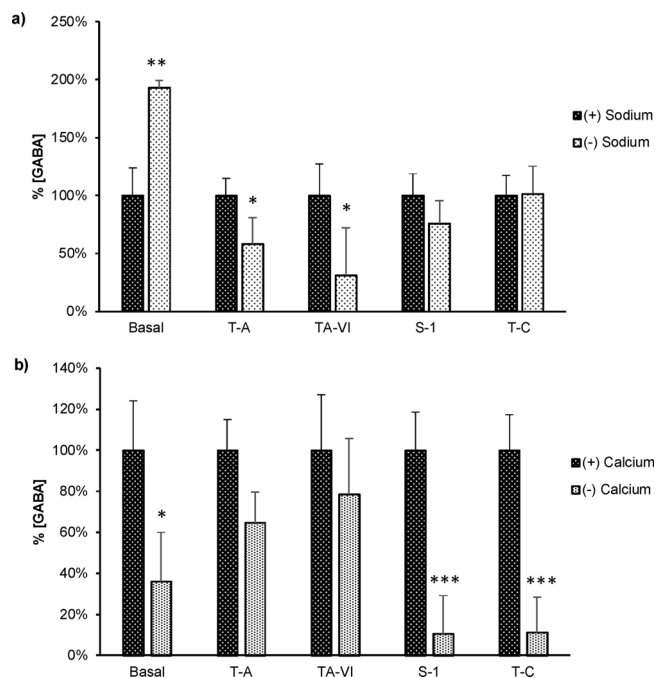


Fig. 3. Per cent of GABA released evoked by *T-A* (20 µg/mL), *TA-VI* (20 µg/mL), *S-1* (10 µg/mL) and *T-C* (10 µg/mL) in cerebral cortex slices under a) sodium-free basal medium or b) calcium-free basal medium. Control condition (100% of basal release). Values are mean percentages ± SEM of 5 independent experiments. ANOVA and t-Student tests; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.005.

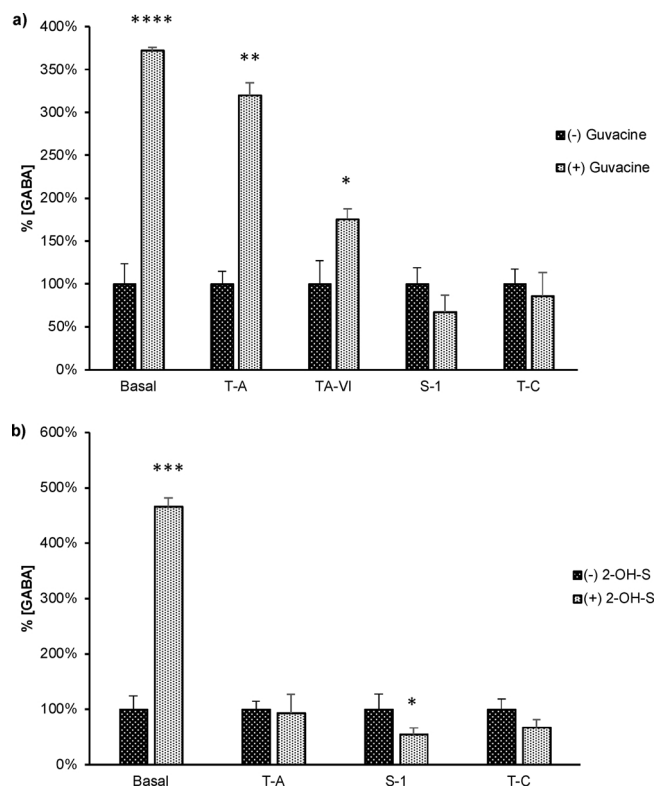


Fig. 4. Per cent of GABA released evoked by *T-A* (20 µg/mL), *TA-VI* (20 µg/mL), *S-1* (10 µg/mL) and *T-C* (10 µg/mL) in cerebral cortex slices in the presence of a) guvacine and b) 2-OH-S. Control values are 100% of basal release (in the absence of guvacine or 2-OH-S). Values are mean percentages ± SEM of 5 independent experiments. ANOVA and t-Student tests; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.005; ****p < 0.001.

synaptic vesicles by the classical Ca²⁺-dependent exocytosis; b) by the reverse transport of the membranal GABA transporter GAT-1, a Ca²⁺-independent process, working in the inside-out direction [21]; c) an increase in cytosolic Na⁺ can facilitate reversal of membrane Na⁺/Ca²⁺ exchangers [22–25], leading to import Ca²⁺ and consequent transmitter release [26]; d) the blockade of the membranal GABA transporter (GAT-1) would enhance extracellular GABA; and finally, e) the synaptically GABA released also can activate presynaptic GABA_B autoreceptors, resulting in a reduction of GABA released, whereas GABA_B receptor blockers may increase the extracellular GABA.

In order to investigate if some of these mechanisms are involved in the glycolipid-induced GABA release observed in this study, we achieved the *in vitro* GABA release assays in the presence or absence of Na⁺ or Ca²⁺ ions. In addition, to explore the probable participation of GAT-1 or GABA_B either guvacine or 2-H-S were added.

Results from Na⁺- and Ca²⁺-dependent GABA release assays suggest that resin glycosides tested increase extracellular GABA by different mechanisms. For instance, *T-C*-GABA release, as well *S-1*, were totally Na⁺-independent and Ca²⁺-dependent, indicating that the membrane depolarization process is not involved, but a vesicular GABA release does, possibly opening Ca²⁺ voltage channels and allowing the vesicular neurotransmitter release. Therefore, the release of GABA could take place by means of either an as yet unidentified vesicular transporter or, as recently suggested, by the reverse transport of the membranal GABA transporter GAT-1 [27]. However, the blockade of the membranal GABA transporter (GAT-1) by *T-C* cannot be discarded, since the addition of guvacine, a GABA uptake blocker, did not show any effect on the *T-C*-evoked GABA release.

Otherwise, for *T-A* and *TA-VI* results, the mechanism suggested is either related to membrane depolarization or to the GABA exit from nerve terminals through their transporters known as *release by transporter reversal* or *carrier-mediated release* [25,28–30]; since both processes are Na⁺-dependent. Although there was a decrease of GABA concentration in the absence of Ca²⁺, that one was not statistically significant, so the GABA release may not be related to vesicular release.

Finally, for other glycolipids, their effect on intracellular calcium concentration changes in CNS is unclear [31]. However, it was observed that *S-1* and *T-C* compounds evoke an *in vitro* increase of the intracellular calcium concentration in assays with human spermatozooids (personal communication), that it would suggest that this increase is due by a probable activation of calcium channels or through second messengers. Taking together, these findings suggest that not all glycolipids tested follow the same mechanism of action, but a pore-forming activity is discarded. Apparently, their chemical structure plays an important role on their activity.

The *in vitro* effects observed of these glycosidic resins on GABAergic system is support for several *in vivo* studies suggesting a probable GABA mechanism. Their effect has been also related with GABA_A receptor function, through to enhance inhibitory activity in CNS. Among the main findings are the studies on anticonvulsant activity against PTZ administration, potentiation of the hypnotic effect of pentobarbital, and effect on the release process of neurotransmitters such as GABA and glutamic acid [4–7,9]; moreover, it is well known that both, PTZ and pentobarbital are drugs that interact with this receptor as antagonist and modulator, respectively [32,33].

Extracts and single compounds from several plants have been shown to act on the same pharmacological targets. On the other hand, our findings suggest that glycolipids tested in this study have different target sites probably related to their different chemical structure. Hence, the variability in chemical structure may be an important aspect to understand the activity of these secondary metabolites.

Resin glycosides used in this study are amphipathic molecules of high molecular weight in relation to other bioactive compounds. They have both hydrophobic (aglycone of fatty acid) and hydrophilic (glycone or saccharide core) segments, and might be forming a macrocyclic ring (macrolactone) and some esterification (fatty acids of short chain)

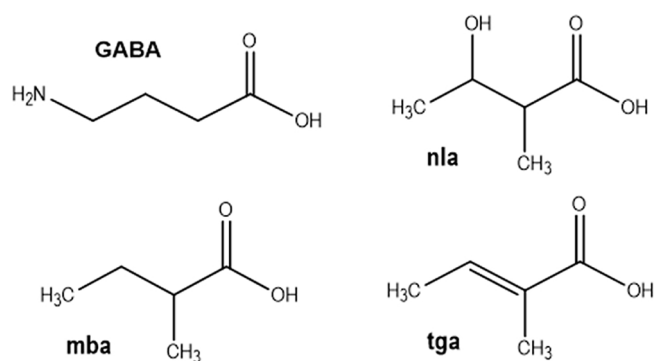


Fig. 5. Chemical structure of *GABA*, nilic acid (*nla*), 2-methylbutanoic acid (*mba*) and tiglic acid (*tga*).

in its aglycone. According to some authors, the macrocyclic structure has been associated with their biological activity, such as antimicrobial and cytotoxic effects [34].

In the present study, although glycolipids tested have similar activity on GABA release, not all of them have a macrolactone motif in their molecule. Furthermore, our results indicate different mechanisms involved in their activity, suggesting that others structural motifs might possibly be implicated [17,35].

The oligosaccharide core of *T-A*, *TA-VI*, *S-I* and *T-C* is formed for the same monosaccharides sequences (quinovose-glucose-rhamnose-quinovose), but their short acid chains esterified are variables (tiglic, nilic, and 2-methylbutanoic acids). These carboxylic acids have been associated with various activities, such as anti-inflammatory, antimicrobial or antitumoral [16,36–38]. It is interesting to note, that these short carboxylic acid chains have a structure similar to GABA neurotransmitter (Fig. 5), suggesting that perhaps, they could be related to the pharmacological activity observed [39,40]. Finally, it cannot be discarded that the differences that show these resin glycosides, with respect to their mechanism of action and the grade of GABA release that they evoked, are related with the global structural characteristics [35], mainly by their spatial conformation.

5. Conclusions

According to *in vitro* assays, all resin glycosides evoked an increase of extracellular endogenous GABA concentration. So, glycolipids affect possibly GABAergic transmission by at least two different mechanisms of action: either modifying GABA release (vesicular pathway) or modulating its release by the GAT and GABA_B function; and not by a pore-forming activity. It is important to emphasize that the glycolipid effects are related to factors such as dosage and structural characteristics, where the fatty acids of short chain are the motifs that might be possibly associated with their activity on CNS. Finally, these compounds represent a great potential for using in the medical field and in the design of new drugs.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT (Grants 90268 and CB2011-168569). J.M. Castro acknowledge postgraduate student scholarship 43923. Authors are grateful to Lucero Valladares Cisneros for all technical support during the project.

References

- [1] J. Flórez, *Farmacología Humana*, 5a ed., Elsevier, Masson, 2008.
- [2] J.R.G.S. Quintans Júnior, J.T. Almeida, X.P. Lima, J.S. Nunes, R.N. Oliveira, P.F. d. Athayde-Filho, J.M. Barbosa-Filho, Plants with anticonvulsant properties: a review, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18 (2008) 798–819.
- [3] M. Meira, J.M. Silva, J.P. David, Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22 (2012)

- 682–713.
- [4] M. Herrera-Ruiz, C. Gutiérrez, J. Enrique Jiménez-Ferrer, J. Tortoriello, G. Mirón, I. León, Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from *Ipomoea stans* roots, *J. Ethnopharmacol.* 112 (2) (2007) 243–247.
- [5] G. Mirón-López, M. Herrera-Ruiz, S. Estrada-Soto, F. Aguirre-Crespo, L. Vázquez-Navarrete, I. León-Rivera, Resin glycosides from the roots of *ipomoea tyrianthina* and their biological activity, *J. Nat. Prod.* 70 (4) (2007) 557–562.
- [6] I. León-Rivera, G. Mirón-López, G.M. Molina-Salinas, M. Herrera-Ruiz, S. Estrada-Soto, M.C. d. Gutiérrez, D. Alonso-Cortés, G. Navarrete-Vázquez, M.Y. Ríos, S. Said-Fernández, Tyrianthinic acids from *ipomoea tyrianthina* and their anti-mycobacterial activity, cytotoxicity, and effects on the central nervous system, *J. Nat. Prod.* 71 (10) (2008) 1686–1691.
- [7] I. León-Rivera, G. Mirón-López, S. Estrada-Soto, F. Aguirre-Crespo, M.C. d. Gutiérrez, G. Molina-Salinas, G. Navarrete-Vázquez, E. Montiel, Glycolipid ester-type heterodimers from *Ipomoea tyrianthina* and their pharmacological activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (16) (2009) 4652–4656.
- [8] I. León-Rivera, M. Herrera-Ruiz, S. Estrada-Soto, M.C. d. Gutiérrez, I. Martínez-Duncker, M.Y. Navarrete-Vázquez, B. Ríos, P. Castillo-España, A. Aguirre-Moreno, Sedative, vasorelaxant, and cytotoxic effects of convolvulin from *Ipomoea tyrianthina*, *J. Ethnopharmacol.* 135 (2) (2011) 434–439.
- [9] I. León-Rivera, J. Castro, G. Mirón-López, F. del Río-Portilla, R. Enriquez, W. Reynolds, S. Estrada-Soto, P. Rendón-Vallejo, M. del Carmen Gutiérrez, M. Herrera-Ruiz, A. Mendoza, G. Vargas, Resin glycosides from *Ipomoea tyrianthina* and their sedative and vasorelaxant effects, *J. Nat. Med.* 68 (4) (2014) 655–667.
- [10] J.L.D. Gómez, Usos de las plantas medicinales de México, Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, 1976.
- [11] M. Martínez, *Las Plantas Medicinales de México*, (1990).
- [12] A. Argüeta, M.C.G. Vázquez, I.N. Indigenista, Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Instituto Nacional Indigenista, 1994.
- [13] M. Noda, K. Ono, T. Miyahara, Resin glycosides. I. isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*, *Tetrahedron* 43 (17) (1987) 3889–3902.
- [14] H. Noda, T. Kogetsu, K. Kawasaki, Scammonins I and II, the resin glycosides of radix scammoniae from *Convolvulus scammonia*, *Phytochemistry* 29 (11) (1990) 3565–3569.
- [15] B. Hernández-Carlos, R. Bye, R. Pereda-Miranda, Orizabins V–VIII tetrasaccharide glycolipids from the Mexican scammony root (*Ipomoea orizabensis*), *J. Nat. Prod.* 62 (8) (1999) 1096–1100.
- [16] R. Pereda-Miranda, B. Hernández-Carlos, HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root, *Tetrahedron* 58 (16) (2002) 3145–3154.
- [17] V.-V.R.R. Pereda-Miranda, M. Bah, A. Lorence, Pore-forming activity of morning glory resin glycosides in model membranes, *Rev. Latinoam. Quím.* 37 (2) (2009) 144–154.
- [18] M.C. Gutiérrez, B.A. Delgado-Coello, Influence of piperolic acid on the release and uptake of [³H]GABA from brain slices of mouse cerebral cortex, *Neurochem. Res.* 14 (5) (1989) 405–408.
- [19] R. Pereda-Miranda, Bioactive natural products from traditionally used Mexican plants, in: J. Arnason, R. Mata, J. Romeo (Eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants*, Springer, US, 1995, pp. 83–112.
- [20] L. Achnine, R. Pereda-Miranda, R. Iglesias-Prieto, R. Moreno-Sánchez, B. Lotina-Hennsen, A. Tricolorin, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts, *Physiol. Plant.* 106 (2) (1999) 246–252.
- [21] S. Bernath, M.J. Zigmond, Calcium-independent gaba release from striatal slices: the role of calcium channels, *Neuroscience* 36 (3) (1990) 677–682.
- [22] W.J. Blaustein, Sodium/calcium exchange its physiological implications, *Physiol. Rev.* 79 (3) (1999) 763–854.
- [23] L. Annunziato, G. Pignataro, G.F. Di Renzo, Pharmacology of brain Na⁺ / Ca²⁺ xchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives, *Pharmacol. Rev.* 56 (4) (2004) 633–654.
- [24] L. Annunziato, P. Molinaro, NCX, Sodium-Calcium Exchanger, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, New York, 2009, pp. 1–17.
- [25] C. Romei, C. Sabolla, L. Raiteri, GABA release provoked by disturbed Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ homeostasis in cerebellar nerve endings: roles of Ca²⁺ channels, Na⁺ /Ca²⁺ exchangers and GAT1 transporter reversal, *Neurochem. Int.* 72 (2014) 1–9.
- [26] J.-F. Padín, J.-C. Fernández-Morales, R. Olivares, S. Vestring, J.-A. Arranz-Tagarro, E. Calvo-Gallardo, R. de Pascual, L. Gandía, A.G. García, Plasmalemmal sodium-calcium exchanger shapes the calcium and exocytotic signals of chromaffin cells at physiological temperature, *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 305 (2) (2013) C160–C172.
- [27] G. Sperk, C. Schwarzer, J. Heilmann, S. Furlinger, R.J. Reimer, R.H. Edwards, N. Nelson, Expression of plasma membrane GABA transporters but not of the vesicular GABA transporter in dentate granule cells after kainic acid seizures, *Hippocampus* 13 (7) (2003) 806–815.
- [28] D. Attwell, B. Barbour, M. Szatkowski, Nonvesicular release of neurotransmitter, *Neuron* 11 (3) (2016) 401–407.
- [29] G. Levi, M. Raiteri, Carrier-mediated release of neurotransmitters, *Trends Neurosci.* 16 (10) (1993) 415–419.
- [30] G.B. Richerson, Y. Wu, Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore, *J. Neurophysiol.* 90 (3) (2003) 1363–1374.
- [31] B.-Y. Fan, Y.-C. Gu, Y. He, Z.-R. Li, J.-G. Luo, L.-Y. Kong, Cytotoxic resin glycosides from *ipomoea aquatica* and their effects on intracellular Ca²⁺ concentrations, *J. Nat. Prod.* 77 (10) (2014) 2264–2272.
- [32] M.T. Fisher, J.L. Fisher, Activation of α6-containing GABA(A) receptors by pentobarbital occurs through a different mechanism than activation by GABA, *Neurosci.*

- Lett. 471 (3) (2010) 195–199.
- [33] F. Ramos-Morales, J. Correa-Basurto, M. Saavedra-Vélez, M. Acosta-Hernández, E. Gasca-Pérez, A. Pérez-Palacios, J. Trujillo-Ferrara, Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante, *Archivos de Neurociencias* 17 (1) (2012) 22.
- [34] R. Pereda-Miranda, D. Rosas-Ramírez, J. Castañeda-Gómez, Resin glycosides from the morning glory family, in: A.D. Kinghorn, H. Falk, J. Kobayashi (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 92, Springer, Vienna, 2010, pp. 77–153.
- [35] K. Vladimir, M. Ludmila, Glycosides in medicine: “The role of glycosidic residue in biological activity”, *Curr. Med. Chem.* 8 (11) (2001) 1303–1328.
- [36] G. Ono, A. Kawakami, K. Takigawa, M. Kabata, J. Okawa, K. Kinjo, H. Yokomizo, T. Yoshimitsu, Calysolins X–XIII, resin glycosides from *Calystegia soldanella*, and their antiviral activity toward herpes simplex virus, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 62 (8) (2014) 839–844.
- [37] M.A.R. Vinolo, H.G. Rodrigues, R.T. Nachbar, R. Curi, Regulation of inflammation by short chain fatty acids, *Nutrients* 3 (10) (2011) 858.
- [38] P. Arantes, L. Sachett, C. Graebin, H. Verli, Conformational characterization of ipomotoasides and their recognition by COX-1 and 2, *Molecules* 19 (4) (2014) 5421.
- [39] K. Salat, K. Kulig, GABA transporters as targets for new drugs, *Future Med. Chem.* 3 (2) (2011) 211–222.
- [40] A. Schousboe, K.K. Madsen, M.L. Barker-Haliski, H.S. White, The GABA synapse as a target for antiepileptic drugs: a historical overview focused on GABA transporters, *Neurochem. Res.* 39 (10) (2014) 1980–1987.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte(Tutor)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Ismael León Rivera

Dra. Maribel Herrera Ruiz

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte(Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Ismael León Rivera
Dra. Maribel Herrera Ruiz
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte(Tutor)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Ismael León Rivera

Dra. Maribel Herrera Ruiz

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ISMAEL LEON RIVERA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte(Tutor)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Ismael León Rivera

Dra. Maribel Herrera Ruiz

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIBEL HERRERA RUIZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte(Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dr. Ismael León Rivera
Dra. Maribel Herrera Ruiz
Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte(Tutor)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Ismael León Rivera

Dra. Maribel Herrera Ruiz

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuente(Tutor)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Ismael León Rivera

Dra. Maribel Herrera Ruiz

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. Gina Lorena Quirarte

Tesis: "EFECTO DE ESCAMONINA 1 Y TIRIANTINA C SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ATRIBUIDA A *Ipomoea tyrianthina*.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE MANUEL CASTRO GARCIA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para

editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. GINA LORENA QUIRARTE