



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFFECTO NOOTRÓPICO DE *Distictis buccinatoria* EN UN  
MODELO DE DETERIORO COGNITIVO INDUCIDO POR  
ESCOPOLAMINA EN RATÓN.

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA DÍAZ PATRICIO

CODIRECTORES

DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

M. EN C. SANDRA LILIANA PORRAS DÁVILA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2021

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Ferrer por abrirme las puertas con su equipo de trabajo y la confianza brindada para la realización de este proyecto, por su apoyo y orientación a lo largo del desarrollo de este.

A la Dra. Maribel Herrera por acogerme como una alumna más, brindarme su apoyo, confianza, consejos y conocimiento. Estoy y estaré siempre agradecida por todo su apoyo, todo mi respeto y admiración.

A mi codirectora Sandy, por el apoyo y confianza a lo largo del desarrollo de este proyecto, por brindarme consejos y conocimiento que me hicieron crecer académicamente, por reforzarme en mis debilidades. Estoy y estaré eternamente agradecida por todo, mi cariño, respeto y admiración.

Al personal del CIBIS por abrirme las puertas y las facilidades otorgadas durante el desarrollo de este proyecto, por su amabilidad y acogerme como parte de su equipo.

Al Dr. Alejandro Zamilpa por su asesoría en la fitoquímica, sus consejos y orientación brindada. Así como el Dr. Manases Cortázar por su apoyo y consejos.

A Jonathan Orduño y José Luis por su apoyo y orientación en la parte técnica del desarrollo de esta tesis.

A mi sínodo evaluador, Dra. Nayeli Monterrosas Brisson, Dr. David Salinas, Dra. María del Carmen, por despejar todas mis dudas, por sus comentarios, sugerencias y consejos brindados a lo largo del desarrollo del proyecto.

A mis compañeros del CIBIS con quienes compartí grandes momentos, por su ayuda y consejos.

Gracias a todos aquellos que hicieron parte del desarrollo del proyecto.

## *Dedicatoria*

A dios, por la fortaleza y bendiciones brindadas siempre.

A mis padres Alejandra Patricio y Lino Díaz, por todo su esfuerzo y sacrificios realizados durante estos años de mi formación, por el apoyo incondicional que me han brindado desde siempre, siendo mi fortaleza y aliento en mis momentos más difíciles. Gracias por su fe, amor, comprensión y confianza, por ustedes he logrado cumplir mis metas. No me alcanza la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí, los amo.

A mis sobrinos Sergio y Ximena, por ser un pilar fundamental de motivación y amor en todo momento.

A mi hermano y cuñada por su confianza, y apoyo incondicional en todo mi proceso.

A mi abuela y tíos que me brindan su confianza y amor, así mismo por sentirse orgullosos de todo lo que he logrado, por sus palabras de motivación e impulsarme a no rendirme nunca.

A mis amigos por su apoyo y motivación en mis días más difíciles, pero siempre estando a mi lado.

## ÍNDICE

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | Introducción .....   | 3  |
| 2.    | Marco teórico .....  | 4  |
| 2.1   | Déficit cognitivo .....  | 4  |
| 2.1.1 | Memoria .....  | 4  |
| 2.2   | Enfermedades asociadas al déficit cognitivo .....  | 5  |
| 2.3   | Sistemas de neurotransmisión en procesos cognitivos: Sistema colinérgico .....                 | 8  |
| 2.4   | Modelos experimentales para el estudio de déficit cognitivo .....                              | 10 |
| 2.4.1 | Modelo de deterioro cognitivo a corto plazo inducido con escopolamina .....                    | 10 |
| 2.4.2 | Laberinto acuático de Morris .....   | 11 |
| 2.4.3 | Campo abierto.....   | 12 |
| 2.5   | Fármacos usados en el tratamiento de deterioro cognitivo .....                                 | 13 |
| 2.5.1 | Desventajas de los fármacos auxiliares en el deterioro cognitivo .....                         | 14 |
| 2.6   | Especies vegetales con actividad nootrópica .....  | 14 |
| 2.7   | Familia Bignonaceae.....   | 15 |
| 2.7.1 | <i>Distictis buccinatoria</i> .....  | 15 |
| 2.7.2 | Nombres comunes y sinonimia científica.....  | 17 |
| 2.7.3 | Antecedentes etnomédicos de <i>Distictis buccinatoria</i> .....                                | 17 |
| 2.7.4 | Química y farmacología de <i>Distictis buccinatoria</i> .....                                  | 18 |
| 3.    | Justificación .....  | 20 |
| 4.    | Hipótesis.....   | 21 |
| 5.    | Objetivos.....   | 22 |
| 6.    | Metodología.....   | 23 |
| 6.1   | Caracterización química de <i>Distictis buccinatoria</i> .....                                 | 24 |
| 6.1.1 | Material vegetal y obtención del extracto diclorometánico de <i>Distictis buccinatoria</i> ... | 24 |
| 6.1.2 | cromatografía líquida en columna.....  | 24 |
| 6.1.3 | Cromatografía en capa fina .....   | 26 |
| 6.1.4 | Cromatografía de alta resolución CLAR .....  | 27 |
| 6.2   | Pruebas biológicas.....  | 27 |
| 6.2.1 | Modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina .....                                  | 28 |
| 6.2.2 | Prueba de laberinto acuático de Morris .....   | 29 |
| 6.2.3 | Prueba de campo abierto (CA).....  | 30 |
| 6.3   | Técnicas espectroscópicas y espectrométricas para elucidación estructural .....                | 31 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 6.4   | Análisis estadístico.....  | 31 |
| 7.    | Resultados.....  | 32 |
| 7.1   | Obtención del extracto y fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> .....   | 32 |
| 7.2   | Separación química de las fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> .....  | 32 |
| 7.3   | Efecto del extracto y fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> sobre el déficit cognitivo inducido con escopolamina en LAM..... | 33 |
| 7.4   | Efecto de <i>Distictis buccinatoria</i> en ratones expuestos al CA.....  | 38 |
| 7.5   | Caracterización química de las fracciones farmacológicamente activas.....  | 39 |
| 7.5.1 | Fracción DbC1F7.....   | 39 |
| 7.5.2 | Fracción DbC1F8-11.....  | 42 |
| 7.6   | Elucidación estructural del compuesto contenido en fracciones activas.....   | 44 |
| 7.6.1 | Análisis RMN de <sup>1</sup> H de la fracción DbC5F45-49.....  | 44 |
| 8.    | Discusión.....   | 47 |
| 9.    | Conclusiones.....  | 51 |
| 10.   | Perspectivas.....  | 52 |
| 11.   | Literatura citada.....   | 53 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Sistema Colinérgico.....  | 9  |
| <b>Figura 2:</b>  | Estructura química de la escopolamina.....  | 11 |
| <b>Figura 3:</b>  | Laberinto acuático de Morris.....   | 12 |
| <b>Figura 4:</b>  | Campo abierto.....  | 12 |
| <b>Figura 5:</b>  | Estructura química Galantamina.....   | 13 |
| <b>Figura 6:</b>  | <i>Distictis buccinatoria</i> .....   | 16 |
| <b>Figura 7:</b>  | Estructura química del (a) ácido 3-O- (E) -p-coumaroil ursólico, (b) ácido 3-O- (Z) -p-coumaroil ursólico (c) ácido ursólico..... | 19 |
| <b>Figura 8:</b>  | Diagrama experimental.....  | 23 |
| <b>Figura 9:</b>  | Diagrama general del fraccionamiento químico.....   | 26 |
| <b>Figura 10:</b> | Diagrama experimental del modelo de inducción del deterioro cognitivo.....  | 28 |
| <b>Figura 11:</b> | Laberinto acuático de Morris.....   | 29 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 12:</b> Caja de acrílico utilizada en la prueba de campo abierto .....  | 30 |
| <b>Figura 13:</b> A) Perfil cromatográfico CCF FN de las fracciones DbC1F7, DbC1F 8, DbC1F 9-11 de <i>Distictis buccinatoria</i> .....  | 32 |
| <b>Figura 14:</b> Efecto del extracto y fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> sobre el tiempo de recorrido en los diferentes cuadrantes (N, S, E, O) hasta la plataforma, en el LAM, de ratones con déficit cognitivo inducido con escopolamina. .... | 34 |
| <b>Figura 15:</b> Efecto del extracto y fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> sobre la distancia recorrida, de ratones con deterioro cognitivo inducido con escopolamina en prueba de LAM.. ....  | 35 |
| <b>Figura 16:</b> Efecto del extracto y fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> sobre tiempo de permanencia sobre el cuadrante O, cuadrante E y plataforma de ratones con deterioro cognitivo inducido con escopolamina en prueba de LAM.....           | 36 |
| <b>Figura 17:</b> Trayectoria representativa de 1 ratón por grupo durante la evaluación en la prueba de LAM.. ....  | 37 |
| <b>Figura 18:</b> Efecto del extracto y fracciones de <i>Distictis buccinatoria</i> sobre la conducta motora en cruces totales (CT) y levantamiento vertical (LV) de ratones con deterioro cognitivo inducido con escopolamina, en prueba de CA.....        | 38 |
| <b>Figura 19:</b> A) Perfil cromatográfico CCF FN de las fracciones DbC2F17-19, DbC2F36-45, DbC2F51-55 de <i>Distictis buccinatoria</i> . ....  | 39 |
| <b>Figura 20:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$ nm) correspondiente al extracto diclorometánico de <i>Distictis buccinatoria</i> .....  | 40 |
| <b>Figura 21:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$ nm) correspondiente a la fracción DbC1F7. ....  | 40 |
| <b>Figura 22:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=270$ nm) correspondiente a la fracción DbFdF17-19 .....  | 41 |
| <b>Figura 23:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=280$ nm) correspondiente a la fracción DbFdF36-45.....   | 41 |
| <b>Figura 24:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$ nm) correspondiente a la fracción DbFdF51-55. ....  | 42 |
| <b>Figura 25:</b> Perfil cromatográfico y sus valores de Rf en capa fina: Ext: extracto de <i>Distictis buccinatoria</i> ; Fracción DbC1F8-11; Ref.: referencia (DbC4F69-81) y fracciones DbC5F45-49, DbC5F66-69.....                                       | 43 |
| <b>Figura 26:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$ nm) correspondiente a la fracción DbC1F8.....   | 43 |
| <b>Figura 27:</b> Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$ nm) correspondiente a la fracción DbC1F9-11 .....   | 44 |
| <b>Figura 28:</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) de herniarina de la fracción DbC5F45-49 .....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 29:</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) herniarina de la fracción DbC5F45-49 ..... | 45 |
| <b>Figura 30:</b> Estructura química de herniarina de la fracción DbC5F45-49 .....  | 46 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Cuadro 1:</b> Especies vegetales mexicanas con actividad nootrópica .....                                 | 14 |
| <b>Cuadro 2:</b> Clasificación Taxonómica de <i>Distictis buccinatoria</i> .....                             | 15 |
| <b>Cuadro 3:</b> Actividad antibacteriana y antifúngica de <i>Distictis buccinatoria</i> .....               | 18 |
| <b>Cuadro 4:</b> Gradiente empleado en CLAR.....   | 27 |
| <b>Cuadro 5:</b> Rendimiento del extracto y fracciones farmacológicamente probadas. ....                     | 32 |
| <b>Cuadro 6:</b> Valores de desplazamiento químico de protón y carbono ( $\delta$ , ppm) de herniarina ..... | 46 |

## ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1:</b> Experimento COSY de DbC5F45-49.....             | 59 |
| <b>Anexo 2:</b> Experimento HSQC de la fracción DbC5F45-49..... | 59 |
| <b>Anexo 3:</b> Experimento HMBC de la fracción DbC5F45-49..... | 60 |

## ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

CA: Campo abierto

CAT: Colina acetiltransferasa

CCF: Cromatografía en capa fina

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución

CLC: Cromatografía líquida en columna

CT: Cruces totales

Db25: Extracto diclorometánico de *Distictis buccinatoria* a 25 mg/kg

Db50: Extracto diclorometánico de *Distictis buccinatoria* a 50 mg/kg

DbC1F7: Fracción 7 diclorometánica de la columna cromatográfica 1

DbC1F8: Fracción 8 diclorometánica de la columna cromatográfica 1

DbC1F9-11: Fracción 9-11 diclorometánica de la columna cromatográfica 1

DCL: Déficit cognitivo leve

EA: Enfermedad de Alzheimer

EP: Enfermedad de Parkinson

EVC: Enfermedad vascular cerebral

EH: Enfermedad de Huntington

ESC: Escopolamina

Gal: Galantamina

ip: Vía intraperitoneal

LAM: Laberinto acuático de Morris

LV: Levantamientos verticales

SNC: Sistema nervioso central.

v.o: Vía oral



## RESUMEN

Dentro de las funciones cognitivas más importantes que se ven afectadas en el deterioro cognitivo es la memoria, considerado como uno de los síntomas prevalentes en enfermedades neurodegenerativas. Como parte de la búsqueda de alternativas terapéuticas las plantas medicinales resultan ser una gran opción, por ello en el presente trabajo se evaluó el efecto del extracto y fracciones de mediana polaridad y polares de *Distictis buccinatoria*, en un modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina en laberinto acuático de Morris.

La administración de escopolamina actúa sobre los receptores muscarínicos del neurotransmisor acetilcolina (ACh), al bloquearlos se observa una pérdida temporal de la memoria. Se llevó a cabo una separación cromatográfica para la obtención de las fracciones de diferente constitución química (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11) siendo administradas a 1.5 mg/kg v.o., extracto diclorometánico a 25 y 50 mg/kg v.o. en un ensayo de pérdida de memoria inducido con escopolamina a 0.15 y 1.5 mg/kg v.i. en ratón. El extracto y fracciones contrarrestaron el efecto de escopolamina sobre la memoria, ya que los grupos tratados al paso de los días de entrenamiento en LAM localizaban de manera más rápida la plataforma, para el día de la prueba los resultados obtenidos en los parámetros evaluados, reflejado en la distancia recorrida y tiempo de permanencia sobre el cuadrante O (donde estaba ubicada la plataforma) y sobre la plataforma, estos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativa ( $p < .05$ ), respecto al grupo vehículo de forma similar a como lo hace la galantamina siendo este el fármaco control positivo de referencia.

La fracción DbC1F7 fue separada químicamente obteniendo las fracciones DbC2F17-19, DbC2F36-45 y DbC2F51-55, siendo analizadas mediante CLAR que de acuerdo con sus tiempos de retención y espectros de UV estos corresponden a una serie de compuestos tipo terpeno. Se realizó el fraccionamiento de DbC1F8-11, obteniendo las fracciones DbC5F45-49 y DbC5F66-69 siendo compuestos de mediana polaridad y polares, así mismo se llevó a cabo la elucidación estructural de la fracción DbC5F45-49 donde de acuerdo con el análisis de elucidación estructural corresponde a un compuesto tipo cumarina: herniarina.

## ABSTRAC

Among the most important cognitive functions that are affected in cognitive impairment is memory, considered one of the prevalent symptoms in neurodegenerative diseases. As part of the search for therapeutic alternatives, medicinal plants turn out to be a great option, therefore in the present work the effect of the extract and fractions of medium polarity and polarity of *Distictis buccinatoria* was evaluated, in a model of cognitive deterioration induced with scopolamine in Morris water maze.

The administration of scopolamine acts on the muscarinic receptors of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), when blocking them a temporary loss of memory is observed. A chromatographic separation was carried out to obtain the fractions of different chemical constitution (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11) being administered at 1.5 mg / kg v.o., dichloromethane extract at 25 and 50 mg / kg v.o. in a memory loss test induced with scopolamine at 0.15 and 1.5 mg / kg i.v. in mouse. The extract and fractions counteracted the effect of scopolamine on memory, since the groups treated over the days of training in LAM located the platform more quickly, for the day of the test the results obtained in the parameters evaluated, reflected in the distance traveled and time spent on the O quadrant (where the platform was located) and on the platform, these groups showed statistically significant differences ( $p \leq .05$ ), with respect to the vehicle group in a similar way as does the galantamine, this being the reference positive control drug.

The DbC1F7 fraction was chemically separated obtaining the DbC2F17-19, DbC2F36-45 and DbC2F51-55 fractions, being analyzed by HPLC that according to their retention times and UV spectra these correspond to a series of terpene-type compounds. The fractionation of DbC1F8-11 was carried out, obtaining the DbC5F45-49 and DbC5F66-69 fractions being compounds of medium polarity and polarity, likewise the structural elucidation of the DbC5F45-49 fraction was carried out where according to the structural elucidation analysis corresponds to a coumarin-like compound: herniarin.

## 1. Introducción

El deterioro cognitivo es descrito como pérdida o disminución en el rendimiento de las funciones cognitivas tales como; memoria, capacidad de juicio y razonamiento. Durante muchos años este padecimiento se ha relacionado al proceso del envejecimiento, sin embargo, actualmente no es considerado como único factor, ya que dichos cambios a nivel cognitivo pueden deberse a múltiples factores como enfermedades crónico-degenerativas con repercusión cerebral, así mismo como la propia dotación genética. Dentro de las funciones cognitivas más importantes que se ven afectadas es la memoria, considerado como uno de los síntomas prevalentes en enfermedades neurodegenerativas. Lo deriva del deterioro de la neurotransmisión en diferentes áreas del sistema nervioso central (SNC); por lo que uno de los hallazgos más importantes particularmente resulta en la disminución de la actividad de acetilcolina (ACh, colinérgica) y el aumento de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual se encarga de hidrolizar a dicho neurotransmisor. A partir de ello se ha creado una primera aproximación para el tratamiento de enfermedades asociadas a este síntoma, con el empleo de los inhibidores de acetilcolinesterasa, que tiene como consecuencia el aumento sináptico de ACh, con lo que mejora los procesos de memoria. A pesar de esto, el consumo prolongado disminuye la calidad de vida de los pacientes debido a los efectos adversos que presentan estos medicamentos. Por lo que actualmente existe demanda por el descubrimiento de nuevas alternativas médicas para el tratamiento. Las plantas medicinales representan dentro de la cultura mexicana un recurso de suma importancia para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades. México es considerado un país de gran riqueza biológica, se han identificado y registrado aproximadamente 4000 especies con atributos medicinales, sin embargo, sólo un 5% de estas ha sido sometida a estudios químicos y farmacológicos. *Distictis buccinatoria* es una planta medicinal comúnmente conocida como “flor roja”, nativa de México y es usada en la medicina tradicional para la inflamación y el dolor. Farmacológicamente, se ha demostrado su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria. Así como la capacidad de fracciones químicamente diferentes para actuar como nootrópico (sustancia orientada al cerebro para mejorar funciones cognitivas y la memoria) basado en un componente inflamatorio. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto nootrópico del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* en modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina (alcaloide antagonista anticolinérgico), así mismo llevar a cabo la caracterización química del extracto y elucidación de compuestos biológicamente activos de la especie mediante técnicas de separación e identificación cromatográfica.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Déficit cognitivo**

El déficit cognitivo se describe como un síndrome clínico caracterizado por la pérdida o el deterioro de las funciones mentales en distintos dominios conductuales y neuropsicológicos, tales como memoria, orientación, comprensión, juicio, lenguaje, reconocimiento visual, conducta y personalidad (IMSS, 2012). Es clasificado como déficit cognitivo leve (DCL) y demencia; el DCL que involucra un déficit en el rendimiento de la memoria que puede tener o no alteraciones en otras funciones mentales, pero que no afecta de manera importante el desempeño del paciente en su vida diaria, este a su vez se subdivide en el DCL amnésico (aDCL) y DCL no amnésico. aDCL se describe como un síndrome en el que predomina la disfunción de la memoria y el DCL no amnésico, es más prominente el deterioro de otras características cognitivas (por ejemplo, lenguaje). La demencia está caracterizada por deterioro cognitivo persistente, se identifica por la pérdida de las funciones intelectuales incluyendo memoria explícita, que interfiere con las actividades del individuo; tanto personales como laborales y sociales (Muñoz & Espinosa, 2016). Los cambios a nivel cognitivo anteriormente mencionados pueden ser atribuidos a múltiples factores vinculados al envejecimiento, que pueden considerarse extrínsecos, tales como enfermedades edad-dependientes con repercusión cerebral (enfermedad cerebrovascular, hipertensión, diabetes, endocrinopatías), patología psiquiátrica, aislamiento sociocultural, alteraciones sensoriales y el propio proceso de envejecimiento. Así como los factores intrínsecos que influyen sobre el devenir de la enfermedad, tales como la reserva funcional y estructura cerebral, la dotación genética, así como el grado de adaptación a los cambios durante su vida (Amor & Martín, 2003).

#### **2.1.1 Memoria**

La memoria se define como un sistema en el que los procesos encefálicos interrelacionados permiten almacenar y recuperar un tipo específico de información. Asimismo, es considerada como una función intelectual que tiene relación estructural y funcional con el sistema nervioso central (SNC), por lo que su disminución se encuentra asociada como uno de los síntomas más importantes que involucran el déficit cognitivo. Dentro de las estructuras cerebrales relacionadas con la memoria en base a estudios experimentales podemos mencionar al hipocampo, tálamo, amígdala del lóbulo temporal, cuerpos mamilares y al cerebelo, entre otras. Hablando bioquímicamente se enfatiza la participación de

diversos neurotransmisores destacando principalmente la acetilcolina (Bajo *et al*, 2016; Tirapu & Muñoz, 2005).

La memoria se caracteriza por adquisición, almacenamiento y reposición de la información, así como las experiencias previas aprendidas, ingresadas por alguna vía sensorial (Pérez *et al*, 2006). Es clasificada desde la perspectiva de su contenido la cual puede ser declarativa también llamada explícita la cual se refiere a hechos, eventos, lugares, que se recuerdan mediante un esfuerzo consciente, la formación de la memoria explícita ocurre en el hipocampo y estructuras subyacentes a este (corteza entorrinal, perineal, parahipocampal), así como al subículo y la amígdala. La memoria no declarativa o implícita, está involucrada en las sensaciones, habilidades y capacidades que se recuerdan de manera involuntaria, acceso es inconsciente y las áreas cerebrales relacionadas son el hipocampo, ganglios basales y el cerebelo, entre otras. Asimismo, se categoriza desde la perspectiva del tiempo y se clasifica como: memoria a corto plazo (MCP) que es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos y permite mantener información por poco tiempo (de segundos a minutos), requiere repetición continua y nos permite realizar actividades cognitivas básicas e inmediatas y la memoria a largo plazo (MLP), es un sistema que permite almacenar gran cantidad de información durante períodos prolongados de tiempo, que pueden variar en su extensión desde meses hasta años. El proceso gradual por el que la reiteración de la información retenida a corto plazo produce cambios neurales que originan la MLP, se denomina consolidación de la memoria (Ruetti *et al*, 2009; Solís & Lopez, 2009).

## **2.2 Enfermedades asociadas al déficit cognitivo**

Las enfermedades asociadas al déficit cognitivo presentan un conjunto de síntomas y signos los cuales desarrollan pérdida progresiva de la memoria, clasificándolas como síndromes neurodegenerativos. Éstos, son procesos patológicos del SNC que aparecen con el paso del tiempo y que se caracterizan por desórdenes neurológicos, dañando células cerebrales y deteriorando la memoria, ésta última como un grave síntoma asociado a diversos padecimientos. Cada enfermedad se caracteriza por presentar una vulnerabilidad selectiva neuronal a nivel del SNC, lo que condiciona la degeneración de áreas concretas, produciendo los síntomas correspondientes de la pérdida de función de estas. De los cuales, la enfermedad de Alzheimer es la de mayor prevalencia, seguida de otras como la enfermedad de Parkinson, enfermedad vascular cerebral o Huntington, por mencionar algunas (Navarrete *et al*, 2000; Rodríguez *et al*, 2016).

## **Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (EA), es un padecimiento neurodegenerativo progresivo, caracterizado por la pérdida creciente de memoria explícita, ligada al depósito de placas amiloides, marañas de neurofibrillas, deficiencias colinérgicas y serotoninérgicas, lo cual eventualmente produce la muerte de neuronas en áreas cerebrales relacionadas a la memoria (Pérez *et al*, 2006). En la EA principalmente, el déficit colinérgico parece ser el trastorno neuroquímico más relacionado con la afectación de la memoria, ya que existen evidencias que asocian este síntoma con la disminución del neurotransmisor acetilcolina (ACh), esto por el aumento de los niveles de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), proteína que degrada al agente neuroquímico y provoca un déficit en la transmisión de impulsos nerviosos, lo que conlleva a una pérdida progresiva de sinapsis colinérgicas en regiones cerebrales relacionadas con funciones mentales, principalmente en el hipotálamo y el hipocampo (Isabel *et al*, 2017; Organización Panamericana de la Salud, 2006). Se ha determinado la EA es más evidente en las mujeres y el riesgo de padecerla se incrementa con la presencia de síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular y depresión (Carrizales *et al*, 2014). En relación con la edad, la incidencia de demencia se duplica cada 10 años a partir de los 60 y se espera un incremento en el número de casos, estimándose más de cien millones para el 2050 a nivel global. Lo anterior, debido al aumento de la esperanza de vida y a que aún no existe un método preventivo ni un tratamiento totalmente efectivo (Zabala & Cadena, 2018).

## **Enfermedad del Parkinson**

Otra de las principales enfermedades asociadas al déficit cognitivo es la enfermedad de Parkinson (EP). Este trastorno es una condición neurodegenerativa que se caracteriza clínicamente por la presencia de síntomas motores, como rigidez, temblor de reposo e inestabilidad postural, así como por la existencia de síntomas no motores, como los cognitivos (memoria, entre otros) o demencia. En la EP tiene lugar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Al igual que en la EA, hay una disminución de células colinérgicas en el cerebro basal anterior y una reducción en el número de sitios de unión a nicotina (Irimia, 2001). Estudios recientes, sugieren que pacientes con EP podrían desarrollar DCL o amnesia en las primeras etapas de la enfermedad, dichas afecciones pueden presentar distintas fisiopatologías a nivel cognitivo. En pacientes con deterioro cognitivo leve asociado a EP (dclEP), el patrón de déficit cognitivo es diferente al de demencia asociada a EP (dEP); se caracteriza, principalmente, por ser de tipo no amnésico. Se han desarrollado estudios de la

evolución cognitiva de los pacientes con EP y los que han comparado el perfil cognitivo entre pacientes con dclEP y dEP, esto ha permitido evidenciar que el patrón de deterioro en un inicio es leve y de tipo fronto-subcortical, mientras que la transición a la demencia está dada por la aparición de déficits que representan alteración de zonas corticales posteriores en donde las alteraciones iniciales que evidencian un perfil frontal pueden explicarse por las disfunciones dopaminérgicas del circuito negro estriado frontal mientras que los cambios cognitivos de origen cortical posterior pueden deberse a alteraciones colinérgicas y a cambios atróficos en amplias zonas de la corteza (Bocanegra *et al*, 2014). Las investigaciones recientes han determinado que cerca de 10 millones de personas en el mundo padecen la EP, afecta al 1% de la población mayor de 60 años y 4-5% de los mayores de 85 años. La prevalencia global de EP varía entre 100-300 por cada 100.000 habitantes y la incidencia está entre 1,5-22 para todas las edades, aunque ambas aumentan de forma dramática conforme avanza la edad, estabilizándose a los 80 años (Marín *et al*, 2018).

### **La enfermedad vascular cerebral**

Además de la EA y EP, La enfermedad vascular cerebral (EVC) también puede ocasionar demencia con consecuente déficit cognitivo. Esta enfermedad se relaciona con cualquier disfunción cerebral, producto de un proceso patológico que envuelva los vasos sanguíneos. Por diversos motivos la EVC puede ocasionar demencia, uno de ellos podría relacionarse con lesiones en la convexidad hemisférica (área irrigada por la arteria cerebral media), que pueden provocar trastornos cognitivos o del comportamiento. Así mismo, como un infarto en el área del tálamo o en el área temporal inferomedial puede producir amnesia y las lesiones en el área irrigada por la arteria cerebral anterior suelen originar trastornos de memoria y abulia. Se estima que su prevalencia es de 1.5 /100,000 habitantes, siendo más frecuente en hombres y es más común en pacientes que han sufrido un infarto cerebral. Después de la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular es la segunda causa de demencia en la actualidad, se calcula que, durante los tres meses siguientes a una EVC, de 20% a 30% de los pacientes son diagnosticados con demencia (Muñoz & Espinosa, 2016).

## **Enfermedad de Huntington**

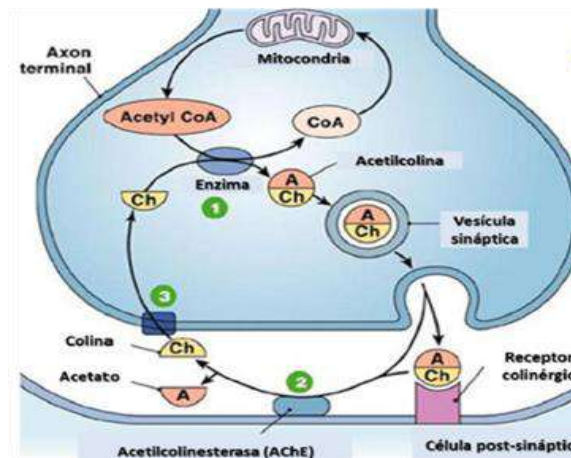
Por último, la enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria, autosómica dominante y progresiva, las características clínicas que se manifiestan son a través de alteraciones neurológicas, psiquiátricas y trastornos cognitivos. Las alteraciones neuropsicológicas que suelen aparecer están clasificadas dentro de lo que se conoce como demencia subcortical, en donde los ganglios basales y el tálamo son las áreas cerebrales que se ven afectadas (Arango *et al*, 2003). Entre los principales trastornos neuropsicológicos que se han descrito en los sujetos con EH, se encuentran: alteraciones visuoespaciales, déficit en memoria y fluidez verbal, enlentecimiento de los procesos cognitivos y problemas de organización, planificación, secuenciación y flexibilidad cognitiva. De acuerdo a los estudios neurológicos de dicha enfermedad, su fisiopatología sugiere daños en la corteza frontal, alteraciones en los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos, agregándose un hipo metabolismo en ganglios basales, tálamo y corteza prefrontal ( Navarrete *et al*, 2008). La EH afecta a todas las razas, está distribuida en todo el mundo en igual proporción entre hombres y mujeres y está considerada como enfermedad rara, con una prevalencia en la población caucásica de 5 a 7 por cada 100.000 habitantes (Martín, 2017).

### **2.3 Sistemas de neurotransmisión en procesos cognitivos: Sistema colinérgico**

Un sistema de neurotransmisión es aquel que permite llevar a cabo la liberación de neurotransmisores a través de un impulso nervioso. El sistema colinérgico incluye neuronas localizadas en el cerebro basal anterior y sus axones largos proyectan a la corteza cerebral e hipocampo, este sistema modula la función cognitiva (Orta *et al*, 2014). El sistema colinérgico está constituido por ACh, sus receptores y el aparato enzimático encargado de su síntesis y degradación. La neurotransmisión colinérgica es mediada por dos tipos principales de receptores para ACh, nombrados históricamente por sus agonistas alcaloides naturales: receptores muscarínicos (metabotrópicos) y nicotínicos (ionotrópicos), los receptores muscarínicos se caracterizan por respuestas prolongadas, resultado de interacciones con sistemas de segundos mensajeros mediados por proteínas G. Por el contrario, las respuestas nicotínicas suelen ser rápidas y breves, ya que, el complejo neurotransmisor-receptor provoca cambios en su estructura que conducen a la apertura de un canal iónico, selectivo para cationes (Sanabria, 2017). La ACh es un neurotransmisor que se involucra en la actividad motora y en el mecanismo de eventos cognitivos como la función de la memoria. La ACh es sintetizada a partir de la



colina, que se acumula en las neuronas colinérgicas mediante una reacción con el acetil CoA y la actividad enzimática de la colina acetiltransferasa (CAT). Una vez sintetizada, parte de ACh se transporta y almacena en vesículas sinápticas. Este proceso es realizado por un transportador vesicular (VACHT), capaz de aumentar su concentración hasta 100 veces dentro de estas vesículas. Después de ser liberado completamente por exocitosis, la ACh interactúa específicamente con los receptores colinérgicos presentes en las membranas pre y postsinápticas. La acción de la acetilcolina cesa cuando se hidroliza a acetato y colina por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), presente en la hendidura sináptica, ya que su papel principal es la terminación de la sinapsis (**Figura 1**) (Ventura *et al*, 2010; Vergara, 2017). Las vías corticales procedentes del núcleo basal de Meynert juegan un papel predominante en los procesos de aprendizaje mediante cambios en la liberación cortical de acetilcolina, que modulan la respuesta cortical a un determinado estímulo. Las vías colinérgicas del hipocampo parecen estar también involucradas en procesos de memoria y asociación. En conjunto, la innervación colinérgica de áreas corticales y límbicas sugiere su participación en procesos de consolidación de la memoria y de componentes emocionales. La degeneración y pérdida de la innervación colinérgica del encéfalo basal es tomada en cuenta como una de las causas del deterioro cognitivo y la pérdida de memoria como síntomas de algunas enfermedades neurodegenerativas (Isabel *et al*, 2017).



**Figura 1:** Sistema Colinérgico, 1 síntesis de ACh, 2 degradación de ACh por AChE, 3 transporte de colina para la síntesis de ACh (Modificada de Vergara, 2017).

## **2.4 Modelos experimentales para el estudio de déficit cognitivo**

Una de las piezas fundamentales en la investigación de las ciencias biomédicas es el modelo animal, que permiten investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades que pueden afectar al ser humano. Asimismo, permiten evaluar productos naturales o sintéticos para el tratamiento de las enfermedades (Montevideo, 2010). Los modelos animales de trastornos cognitivos son basados principalmente en primates, ratones y ratas, cuyos procesos neurológicos son similares funcionalmente al de los humanos (Wong & Pardo, 2015).

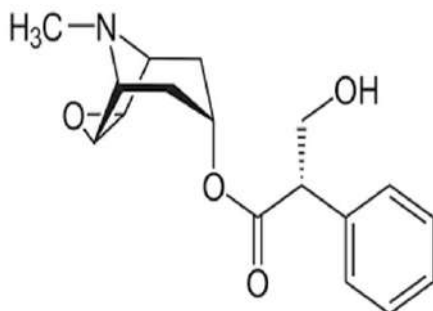
### **2.4.1 Modelo de deterioro cognitivo a corto plazo inducido con escopolamina**

El modelo de deterioro cognitivo es usado en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, se usa tradicionalmente como una manera rápida de explorar la memoria a corto y a largo plazo del animal mediante el uso de modelos conductuales como el Laberinto Acuático de Morris e inducción de escopolamina, este compuesto de referencia es uno de los más empleados para inducir déficit cognitivo, el uso de este antagonista competitivo no selectivo de los receptores colinérgico-muscarínicos se sugiere como la vía más efectiva de bloquear la neurotransmisión colinérgica, la cual se asocia con déficit en el aprendizaje y la memoria. Permite estudiar el efecto de los candidatos terapéuticos en los diferentes procesos de formación de la memoria: adquisición, consolidación, almacenamiento y recuperación (Wong & Pardo, 2015).

#### **2.4.1.1 Escopolamina**

La escopolamina es un alcaloide natural, el cual bloquea la transmisión colinérgica por su acción sobre la célula efectora, por unirse a los receptores muscarínicos (corticales, subcorticales y periféricos) inhibiendo así las respuestas a la estimulación de las fibras colinérgicas posganglionares y a la ACh (**Figura 2**). Una de las regiones más importante de la intervención colinérgica central es el sistema límbico y la corteza asociativa, cuyas funciones superiores (aprendizaje, memoria, cognición, etc.) (Milena & Roa, 2013). La transmisión colinérgica relacionada con los procesos cognitivos ha sido estudiada desde hace mucho tiempo, formulando diversas hipótesis de dicha relación, estudios han demostrado que la memoria, el aprendizaje, la velocidad de procesamiento y la atención, son modulados por cambios en la vía colinérgica (Svoboda *et al*, 2017). La escopolamina al tener la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica es capaz de afectar principalmente la memoria, en

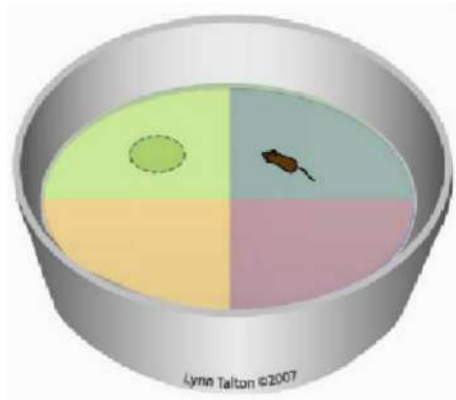
gran medida porque esta depende de la acetilcolina como neurotransmisor y muy especialmente sobre los receptores colinérgicos muscarínicos del núcleo basal de Meynert en la base del lóbulo frontal. Al afectarse dicho núcleo por la acción anticolinérgica de la escopolamina, se altera de manera significativa la transmisión de la información a los sitios de almacenamiento, en especial al hipocampo, es decir que la información no se puede almacenar adecuadamente (Bernal *et al*, 2013).



**Figura 2:** Estructura química de la escopolamina, Imagen recuperada de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-)

#### 2.4.2 Laberinto acuático de Morris

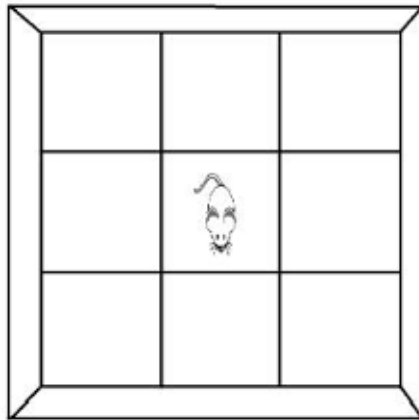
El laberinto acuático de Morris (LAM) se estableció por primera vez por el neurocientífico Richard G. Morris en 1981, con la finalidad de poner a prueba el comportamiento dependiente del hipocampo aprendizaje y la memoria, incluyendo la adquisición de memoria espacial a largo plazo. Dicha prueba consiste en colocar al roedor en una piscina redonda de diámetro específico con una plataforma escondida a pocos centímetros bajo la superficie del agua, la cual el roedor debe encontrarla para apoyarse y pueda dejar de nadar (**Figura 3**). A medida que se repitan sucesivamente este ensayo, el animal deberá aprender donde está localizada la plataforma y así nadar directamente hacia ella. La principal ventaja del LAM es que el roedor aprenderá la diferenciación entre el espacio (plataforma oculta) y lo no espacial (visibilidad de la plataforma) (Nazir *et al*, 2018; Vicens *et al*, 2003).



**Figura 3:** Laberinto acuático de Morris (Modificada de Cocoma *et al*, 2017).

### 2.4.3 Campo abierto

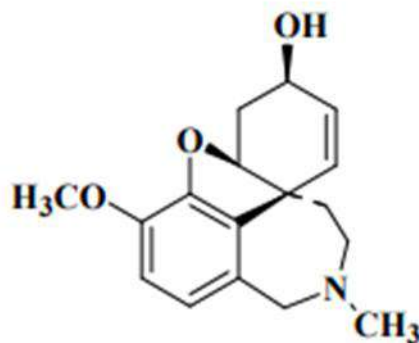
El campo abierto (CA) es una prueba que permite evaluar de manera general el estudio y análisis del comportamiento de los roedores en un espacio que no tiene salida, por lo que permite evaluar de manera cuantitativa y cualitativa la actividad locomotora general y exploratoria. La disminución de la actividad motora se interpreta como una depresión del SNC o bien un incremento de la actividad representa un efecto excitador sobre el mismo. La prueba de CA consiste en evaluar cuales son los comportamientos realizados dentro de la caja (**Figura 4**), uno de ellos es el número de veces que se coloca sobre las patas traseras para intentar salir a los que se les llama levantamientos verticales (LV) y el número de cuadrantes visitados durante el tiempo de la prueba o cruces totales (CT)(Cocoma *et al*, 2016).



**Figura 4:** Campo abierto, imagen recuperada de:  
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/58>

## 2.5 Fármacos usados en el tratamiento de deterioro cognitivo

Existen diversos fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades asociadas al déficit cognitivo, el desarrollo farmacológico se ha centrado en estrategias para mejorar la función colinérgica central, lo que ha permitido mejorar la memoria y otras deficiencias cognitivas producidas por dichas enfermedades. Los fármacos inhibidores de acetilcolinesterasa como donepezilo, tacrina, galantamina y rivastigmina, son capaces de inhibir el catabolismo del neurotransmisor y aumentar la permanencia, lo cual permite mejorar la función cognitiva de éste en la sinapsis, actividades de la vida diaria y síntomas neuropsiquiátricos, sin embargo, no previenen la progresión de dicha enfermedad (Carretero 2003; Jordán 2001). Uno de los fármacos más usados en este padecimiento es la galantamina, este es un alcaloide terciario aislado por primera vez en 1952 del bulbo de *Galanthus woronowii*, es un inhibidor moderado, y actúa en el sistema colinérgico en diferentes mecanismos (**Figura 5**) (Olivera & Pelegrín, 2015). La galantamina lleva a cabo como primer mecanismo la inhibición competitiva y reversible de la AChE, interactúa con la cavidad del sitio activo y aromático de la enzima dando lugar a una inhibición de manera reversible, con ello aumentando la biodisponibilidad sináptica de acetilcolina para unirse a los receptores disponibles. Un segundo mecanismo, independiente de la inhibición de la acetilcolinesterasa, comienza con su unión al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) en un sitio de unión distinto al de la ACh, denominado sitio alostérico. Cuando la galantamina y la ACh se unen simultáneamente a sus sitios de unión, el receptor nicotínico presináptico se hace más sensible a la ACh, por lo que se amplifica su respuesta. La estimulación presináptica del nAChR produce una retroalimentación positiva incrementando la liberación de ACh en la terminal sináptica. Este mecanismo, que incrementa la neurotransmisión nicotínica, se denomina regulación alostérica positiva de los receptores nicotínicos (González & Frade, 2007; Segovia, 2015).



**Figura 5:** Estructura química Galantamina (Modificada de Lorrio,2007).

### 2.5.1 Desventajas de los fármacos auxiliares en el deterioro cognitivo

Los inhibidores de la AChE, útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas al déficit cognitivo, inducen cambios en la fisiología que limitan su éxito por su toxicidad hepática dependiente de la dosis y sus efectos secundarios adversos tales como la anorexia, diarrea, fatiga, náuseas, calambres musculares, así como alteraciones gastrointestinales, cardiorrespiratorias, genitourinarias y del sueño. Dada la efectividad limitada y los efectos adversos que provocan los fármacos utilizados actualmente, existe un gran interés por el descubrimiento de nuevas alternativas médicas para el tratamiento de dichas enfermedades (Isabel *et al*, 2017).

### 2.6 Especies vegetales con actividad nootrópica

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) una planta medicinal es aquella que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos que pueden servir como principios activos o precursores para la semisíntesis de nuevos fármacos por lo que para el 2005 se estimaba que más del 80% de la población mundial las utilizaba de manera rutinaria para satisfacer sus principales necesidades de salud (Bermúdez *et al*, 2005). Debido a los efectos adversos que provocan los fármacos utilizados actualmente en las enfermedades asociadas al déficit cognitivo, se buscan alternativas de nuevos tratamientos, por lo que las plantas medicinales son una opción al ser utilizadas desde nuestros antepasados hasta la actualidad. En el siguiente cuadro (**Cuadro 1**) se presentan las plantas utilizadas en la medicina tradicional en México para el tratamiento de memoria (nootrópico), enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Isabel *et al*, 2017).

**Cuadro 1:** Especies vegetales mexicanas con actividad nootrópica

| Espece                     | Familia       | Usos medicinales/evaluación farmacológica.        | Referencia                        |
|----------------------------|---------------|---|-----------------------------------|
| <b>Salvia officinalis</b>  | Lamiaceae     | Contra depresión, vértigo, Alzheimer.             | (Barbosa <i>et al</i> , 2006)     |
| <b>Melissa officinalis</b> | Lamiaceae     | Antiséptico, para mejorar memoria, contra estrés. | (Akhondzadeh <i>et al</i> , 2006) |
| <b>Valeriana</b>           | Valerianaceae | Diurético, calmante,                              | (Adams <i>et al</i> , 2007)       |

|                                    |                     |                                  |                               |
|------------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <b><i>edulis</i></b>               |                     | para mejorar memoria.            |                               |
| <b><i>Magnolia officinalis</i></b> | <i>Magnoliaceae</i> | Problemas cardiacos y Alzheimer. | (Barbosa <i>et al</i> , 2006) |

## 2.7 Familia Bignonaceae

La familia Bignoniaceae comprende 116 géneros y alrededor de 750 especies de distribución tropical, con algunas especies en los subtrópicos y regiones templadas de Asia (Sánchez, 2012). Las Bignoniaceas son árboles o trepadoras leñosas, poco frecuente como arbustos y rara vez como plantas herbáceas, a menudo con tallos angulosos, yemas axilares con las escamas externas pseudoestipulares a veces foliáceas. Sus hojas generalmente son opuestas, pero también verticiladas o alternas, pecioladas, simples o compuestas, a menudo pinnadas o bipinnadas sin estípulas. Flores vistosas en racimos en cimas o racimos, axilares o terminales, bisexuales generalmente zigomorfas. Sus semillas son bialadas y arrugadas, a menudo, papilosas o pubescentes, por lo general bien delimitadas del cuerpo de la semilla y el hialino-membranoso (Lorenzo, 2016).

### 2.7.1 *Distictis buccinatoria*

Actualmente, la descripción taxonómica es proporcionada por el instituto de biología UNAM (**Cuadro 2**) (Martínez, 2006).

**Cuadro 2:** Clasificación Taxonómica de *Distictis buccinatoria*

|                |                               |
|----------------|-------------------------------|
| <b>Reino</b>   | <b>Plantae</b>                |
| <b>Phylum</b>  | Tracheophyta                  |
| <b>Clase</b>   | Magnoliopsida                 |
| <b>Orden</b>   | Lamiales                      |
| <b>Familia</b> | Bignoniaceae                  |
| <b>Genero</b>  | Distictis                     |
| <b>Especie</b> | <i>Distictis buccinatoria</i> |

*Distictis buccinatoria* es una planta endémica de México, su distribución va del centro al sur del país en zonas rocosas o caducifolias, planta trepadora vigorosa, siempre verde, tallos angulosos, velutinosos o pelosos. Presenta pseudoestipulas foliáceas, ovadas o lanceoladas de 5 mm de largo, generalmente persistentes, sus hojas son bifoliadas, acabadas en un zarcillo filiforme trifido. Sus Inflorescencias se presentan en racimos terminales de hasta 24 cm de largo, con el pedúnculo, raquis y pedicelos normalmente tomentosos, la corola que al abrir tiene un tubo amarillo o rojo- anaranjado, tornándose posteriormente totalmente roja, de 9 a 12 cm de longitud, gradualmente tubular infundibuliforme, tomentosa exteriormente. Sus semillas de 1 x 4 cm, glabras, aladas (**Figura 6**) (Lorenzo, 2016).

En la obra escrita por Bernardino de Sahagún llamada “Historia general de las cosas de la Nueva España”, basada en la documentación en lengua náhuatl reunida por los propios indígenas, menciona “una flor medicinal que se llama tonacaxóchitl, es olorosa, parase por la tierra y encaramase por los árboles y por las peñas; tiene las hojas verdes, larguillas y anchuelas, las flores entre las hojas. Son estas flores amarillas tirantes a colorado, largas como un dedo, huecas y algo vellosas, tiene un suave olor (De Sahagún, 1830).



**Figura 6:** *Distictis buccinatoria*, Imagen recuperada de:<http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023>



### 2.7.2 Nombres comunes y sinonimia científica

Se acepta *Distictis buccinatoria* (DC.) A. H. Gentry (1973), como un sinónimo de *Amphilophium buccinatorium* (DC.) L.G. Lohmann (Missouri ,2014). Otros sinónimos científicos que se reconocen son *Pithecoctenium buccinatorium* (DC.) (1845), *Phaedranthus buccinatorius* (DC.) (1863), *Bignonia buccinatoria* (DC.) (1882) (Kewscience,2020).

Los nombres comunes que se le atribuyen a esta planta son: tonacaxóchitl (por su nombre en náhuatl), bignonia, trompetero, trompetilla grande, clarín, hiedra bocina y flor roja, entre otras. (Estrada *et al*, 2011) .

### 2.7.3 Antecedentes etnomédicos de *Distictis buccinatoria*

Es una planta mexicana que se ha usado desde tiempos prehispánicos con fines médicos. Existen pocas referencias bibliográficas de esta especie en cuanto a su uso en la medicina tradicional, sin embargo, se describen a continuación de las que se tiene conocimiento.

En el año de 1552, el indígena Martín de la Cruz, un experto de procedimientos bajo experiencias previas, realiza un manuscrito azteca que llevo por nombre “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*”, Escribió, en Tlatelolco, un opúsculo acerca de las hierbas y medicina de los indios. En el capítulo llamado “contra la fetidez de los enfermos”, se hace referencia a tonacaxóchitl como “este mal olor se quita si se unge el cuerpo con el jugo de las hierbas *ayauhtonaxiuh*, *papaloquilitl*, *xiuhecapatli*, bien molidas en agua, más el de las ramas de pino y de las flores de *ocoxochitl*, *tonacaxochitl*, *totolactzin* y también espigas” (De la Cruz, 1964).

De la misma obra de Bernardino de Sahagún se menciona que para su uso: “muélanse estas flores juntamente con la hierba que se llama *tlachichinoaxihutl*, bebida y mezclada con agua, es contra el calor interior, también aclara la orina” (De Sahagún, 1830).

Hoy en día, parteras empíricas y herbolarios en el estado de Morelos, en México, usa la decocción de su flores para tratar la tos, angina, inflamación, faringitis y tos con sangre (Rojas *et al*, 2007). La Importancia cultural de *tonacaxóchitl*, en México se ha grabado en murales pintados en conventos católicos, como el de Malinalco en el estado de México (Herrera *et al*, 2015).

#### 2.7.4 Química y farmacología de *Distictis buccinatoria*

Se ha realizado poca investigación de esta especie, por lo que actualmente, se cuenta con poca información. Se mencionan tres trabajos previos que demuestran actividad antibacteriana, antiinflamatoria y nootrópica en el año 2007, 2015 y 2018 respectivamente, los cuales serán descritos a continuación.

##### Actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica

Rojas y colaboradores en el 2007, realizaron un estudio en el que probaron los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de flores y hojas provenientes de *Distictis buccinatoria* para demostrar su actividad contra bacterias y dermatofitos, además de su capacidad citotóxica. En el **cuadro 3** se muestra un resumen de estos estudios (Modificado de Rojas *et al*, 2007).

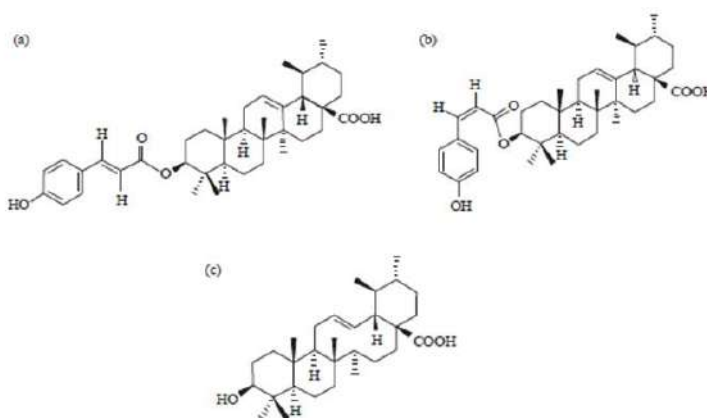
**Cuadro 3:** Actividad antibacteriana y antifúngica de *Distictis buccinatoria*

| Parte de la planta utilizada | Tipo de extracto                   | Actividad      | Microorganismos  |
|------------------------------|------------------------------------|----------------|--|
| Flores                       | Hexano<br>Diclorometano<br>Metanol | Antibacteriana | ✓ <i>Staphylococcus aureus</i><br>✓ <i>Streptococcus pyogenes</i><br>✓ <i>Streptococcus faecalis</i> |
| Flores y hojas               | Hexano<br>Diclorometano<br>Metanol | Antifúngica    | ✓ <i>Trichophyton mentagrophytes</i><br>✓ <i>Trichophyton rubrum</i>                                 |

Los extractos también se probaron en las líneas celulares tumorales humanas de carcinoma nasofaríngeo (KB) y carcinoma de colon (HTC-15). En dicho estudio se muestra que los extractos de hexano y diclorometano de las flores tienen actividad citotóxica significativa contra KB, con valores ED<sub>50</sub> de 15.8 y 8.3 mg = mL. Mientras que no fueron efectivos contra HCT-15 (Rojas *et al*, 2007).

## Actividad antiinflamatoria

En un estudio posterior se indica que las fracciones de un extracto de diclorometano, que contiene los compuestos: (a) ácido 3-O- (E) -*p*-coumaroil ursólico, (b) ácido 3-O- (Z) -*p*-coumaroil ursólico y el (c) ácido ursólico (**Figura 7**), tienen actividad antiinflamatoria al disminuir el edema auricular en ratón-inducido con éster de forbol 12-orto-tetra, decanoil forbol-13 acetato (TPA) (Herrera *et al*, 2015).



**Figura 7:** Estructura química del (a) ácido 3-O- (E) -*p*-coumaroil ursólico, (b) ácido 3-O- (Z) -*p*-coumaroil ursólico (c) ácido ursólico (modificada de Herrera *et al*,2015).

## Actividad neuroprotectora

El estudio más reciente que se tiene sobre esta especie vegetal estuvo basado en su efecto antiinflamatorio, que sirvió de base para evaluar la capacidad de fracciones de la planta para disminuir la neuroinflamación-inducida con un lipopolisacárido (esta endotoxina es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas), en ratones. En dicho modelo se observó que la neuroinflamación estuvo marcada por un incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  en el cerebro, acompañado de un estado pro-oxidante que llevó a un estado de deterioro cognitivo, medido como pérdida de la memoria. Todos estos parámetros de daño fueron significativamente disminuidos con la administración oral de fracciones de diferente constitución química de *Distictis buccinatoria*. Cabe resaltar que el efecto nootrópico observado, resulta ser el principal antecedente que sirve de base para la presentación de este proyecto de investigación. Las fracciones de la planta fueron capaces de disminuir los eventos relacionados al deterioro cognitivo de los ratones en el laberinto acuático de Morris, resaltando que este factor fue ocasionado por un proceso inflamatorio a nivel central (Porras *et al*, 2018).

### 3. Justificación

El deterioro cognitivo es la pérdida de funciones tales como orientación, memoria, capacidad de juicio y razonamiento. Las causas de dicho padecimiento pueden ser factores extrínsecos (envejecimiento, aislamiento sociocultural, alteraciones sensoriales) y factores intrínsecos del individuo (reserva funcional y estructural cerebral, genética). Dicho deterioro constituye uno de los problemas de salud pública más importantes en países desarrollados, siendo la memoria una de las funciones cognitivas que se ve afectada. La memoria es abordada clínicamente con la prescripción de fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), entre ellos la galantamina, ya que el déficit colinérgico parece ser el trastorno neuroquímico más relacionado con la afectación de la memoria. Sin embargo, su consumo está asociado con efectos adversos que impiden la mejoría en la calidad de vida de los pacientes. Por lo que se continúa con la búsqueda de mejores tratamientos y las plantas medicinales, resultan ser una fuente útil de éstos. *Distictis buccinatoria*, planta nativa de México cuyo uso medicinal se basa en disminuir la inflamación y el dolor. Farmacológicamente, se ha demostrado su actividad antiinflamatoria y neuroprotectora, al disminuir la inflamación, el estrés oxidante en cerebro y con ello ejercer una actividad nootrópica, todo basado en un proceso de inflamación a nivel central. Por su actividad neuroprotectora en el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto nootrópico del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre el deterioro de la memoria inducido con escopolamina en la prueba conductual de Laberinto acuático de Morris.

#### **4. Hipótesis**

El extracto, fracciones y/o compuestos de *Distictis buccinatoria* disminuirán el deterioro de la memoria de ratones causada por escopolamina.

## 5. Objetivos

### Objetivo general

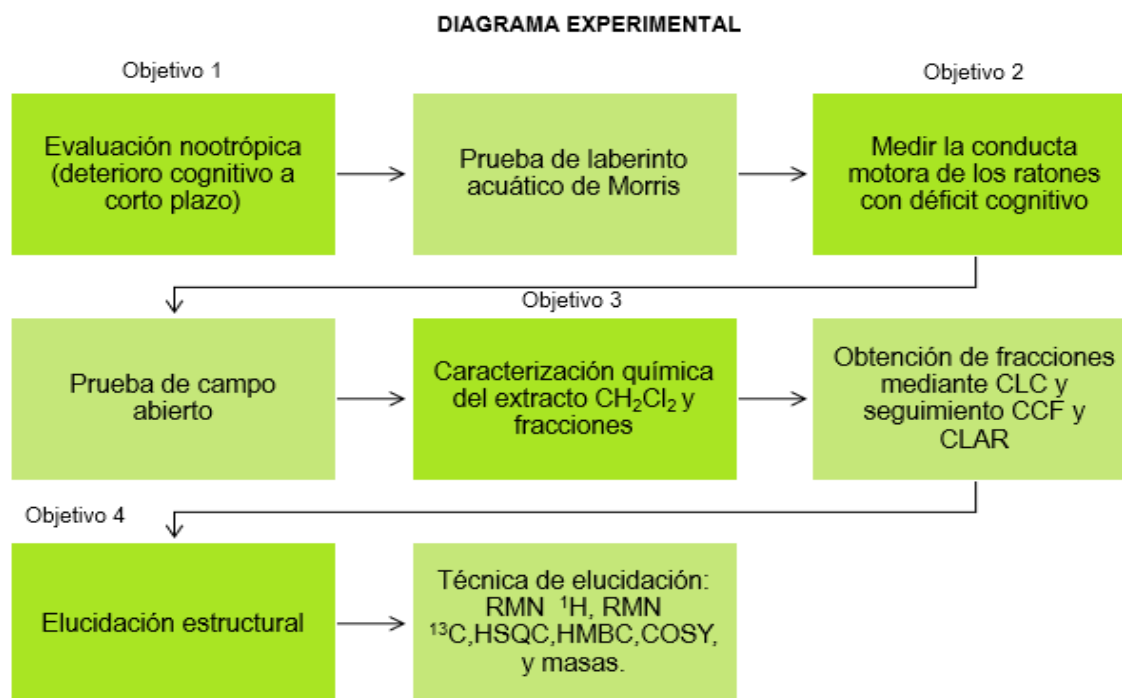
Evaluar el efecto nootrópico de *Distictis buccinatoria* en ratones con déficit cognitivo inducido con escopolamina.

### Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto nootrópico del extracto diclorometánico y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre la memoria y aprendizaje, en ratones con déficit cognitivo inducido con escopolamina en la prueba de laberinto acuático de Morris.
2. Medir la conducta motora de los ratones con déficit cognitivo inducido con escopolamina, y que reciban como tratamiento extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria*, en la prueba de campo abierto.
3. Realizar la caracterización química del extracto diclorometánico y fracciones con actividad nootrópica de *Distictis buccinatoria* mediante técnicas de separación e identificación cromatográfica.
4. Elucidar la estructura química de al menos un compuesto de las fracciones con mayor actividad nootrópica de *Distictis buccinatoria* mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas.

## 6. Metodología

A continuación (**Figura 8**), se muestra el diagrama experimental general indicando cada uno de los procedimientos que se seguirán para dar cumplimiento a los objetivos planteados.



**Figura 8:** Diagrama experimental. CLC Cromatografía líquida en columna; CCF, cromatografía en capa fina; CLAR, Cromatografía líquida de alta resolución; RMN resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ ) y Carbono ( $^{13}\text{C}$ ); HSQC, Heteronuclear Simple Quantum Coherence, HMBC Heteronuclear Multiple Bond Coherence y COSY Correlated Spectroscopy.

## **6.1 Caracterización química de *Distictis buccinatoria***

### **6.1.1 Material vegetal y obtención del extracto diclorometánico de *Distictis buccinatoria***

Las partes aéreas de *Distictis buccinatoria* se recolectaron de plantas que crecen en Tetela del Volcán, estado de Morelos, México. Posteriormente se secaron y almacenaron en CIBIS- IMSS. Para la obtención del extracto el material vegetal (hojas y flores) se secó a temperatura ambiente en condiciones oscuras y se pulverizó usando un molino eléctrico de cuchillas marca Pulvex plastic, (México), provisto de una malla para obtener partículas de 4 a 6 mm de tamaño. A continuación el material vegetal seco y molido se extrajo mediante maceración secuencialmente en hexano y diclorometano en una proporción de 5L por cada Kg de planta seca durante 24 h a temperatura ambiente, éste se filtró y después se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotavapor (Buchí Rotavapor R-114, (Alemania) a temperatura constante de 40 °C y 77 rpm, repitiendo tres veces este procedimiento y el extracto líquido se filtró, y se concentró por destilación a presión reducida mediante rota evaporación y se secó a presión reducida. Se calculó el rendimiento obtenido del extracto de diclorometánico (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Porras *et al*, 2018).

### **6.1.2 Cromatografía líquida en columna**

Con el objetivo de buscar la fracción más activa del extracto diclorometánico de *Distictis buccinatoria* en los modelos farmacológicos, se realizó un análisis químico. Llevándose a cabo mediante una técnica de separación por cromatografía en columna con la finalidad de obtener fracciones con posible actividad nootrópica.

Las fracciones fueron obtenidas a partir del extracto diclorometánico, iniciando una cromatografía líquida en columna (CLC), utilizando como fase estacionaria silica gel fase normal (FN) 0.063-0.200 mm de la marca Merck. La columna 1 (C1) se empaco con 62 g de silica gel FN, iniciando el sistema con diclorometano, haciendo cambios de polaridad con metanol al 2% (100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 85:15, 80:20, 50:50, 0:100), colectando muestras de 100 ml las cuales fueron concentradas por destilación a presión reducida y monitoreadas según su perfil químico mediante cromatografía en capa fina (CCF), obteniendo 31 fracciones que posteriormente fueron reunidas en 11 fracciones de acuerdo a su composición química, estas fueron etiquetadas como DbC1.



Continuando con la separación química se inició la columna 2 (C2) a partir de la fracción DbC1F7 con un peso de 0.7728 g obtenida en la columna 1. Se inicio una columna FN con hexano: acetato de etilo con un gradiente de polaridad del 5% y a partir del sistema 80:20 se hicieron cambios de polaridad al 2% (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 78:22, 76:24, 72:28, 70:30, 68:32, 66:34, 64:36, 62:38, 60:40, 58:42, 56:44, 30:70, :0100). Las muestras fueron colectadas en viales de 10 ml, las fracciones se monitorearon mediante CCF obteniendo 92 fracciones las cuales fueron reunidas según su perfil cromatográfico y etiquetadas como DbC2.

Se realizo la reunión de las fracciones DbC1F8-11 farmacológicamente probadas con la finalidad de tener mayor cantidad de material vegetal además de su similitud de su perfil químico en CCF para continuar con la separación química, con un peso de 2 g inició la tercera columna cromatográfica en FN se inició a partir en un sistema de elución diclorometano: metanol con cambios de polaridad al 2% (100:0, 98:2, 96:4, 90:1, 80:20, 0:100). Se obtuvieron un total de 45 fracciones y se agruparon según su perfil cromatográfico en 13 fracciones y se etiquetaron como DbC3, de las cuales se tomó la reunión DbC3F12-15 para continuar la separación.

Para la cuarta columna se inició la separación cromatográfica de la reunión DbC3F12-15 en una columna fase reversa (FR) 0.015 0.025 mm de la marca Merck con un sistema de elución de agua: acetonitrilo con cambios de polaridad al 10% (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 0:100) recolectando muestras de 10 ml, donde se obtuvo un total de 81 fracciones que posteriormente fueron agrupadas en 22 fracciones y etiquetadas como DbC4.

Por último, se inició una quinta columna FR de la reunión DbC469-81 con un sistema de elución de agua: acetonitrilo empezando con cambios de polaridad al 5% (80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 45:55, 30:70, 100:0) recolectando muestras de 10 ml, obteniendo un total de 81 fracciones que fueron agrupadas en un total de 13 reuniones y etiquetadas como DbC5. Se selecciono la fracción DbC5F45-49 para su elucidación estructural donde se logró aislar un compuesto tipo cumarina mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

### 6.1.3 Cromatografía en capa fina

Para el monitoreo del perfil químico en cada muestra obtenida de la CLC, se llevó a cabo mediante el análisis de cromatografía en capa fina (CCF), donde se utilizó como fase estacionaria placas de sílica gel 60 de fase normal (F254) o fase reversa (RP18F254s) de la marca Merck y como fase móvil un sistema de disolventes ajustado según la polaridad requerida (diclorometano, metanol, hexano, acetato de etilo, agua y acetonitrilo). Las placas eluidas se observaron en luz ultravioleta (Detector marca UVGL-58, UVP, Cambridge, UK) a longitudes de onda corta (254 nm) y larga (365 nm). Por último, se revelaron con distintos reveladores de color, que permiten la identificación de grupos compuestos basándose en distintas coloraciones que se producen por reacción química con la muestra analizada.

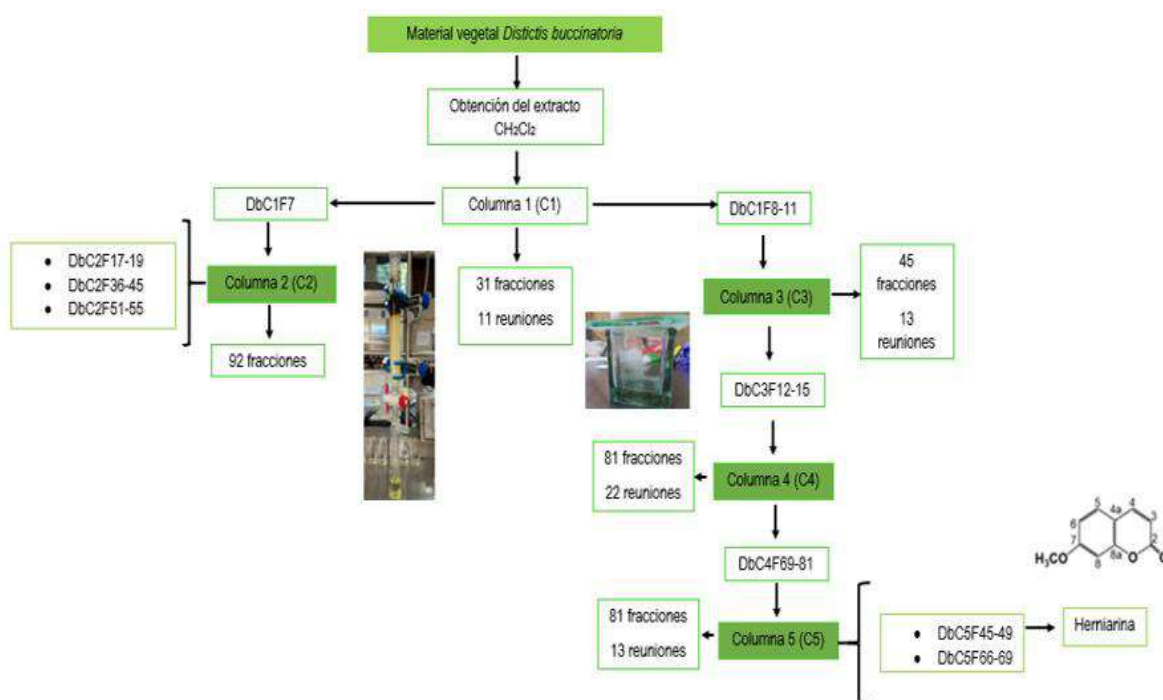


Figura 9: Diagrama general del fraccionamiento químico

A partir de los perfiles cromatográficos obtenidos en CCF se seleccionaron las fracciones DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11 para ser evaluadas en el modelo farmacológico de deterioro cognitivo inducido con escopolamina mediante Laberinto Acuático de Morris (LAM).

#### 6.1.4 Cromatografía de alta resolución CLAR

Las fracciones DbC2F17-19, DbC2F36-45 y DbC2F51-55 provenientes de la separación cromatográfica de la fracción farmacológicamente probada DbC1F7, se diluyeron en metanol a concentraciones 1 mg/ml y fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en un cromatógrafo Waters 2695 acoplado a un detector UV de serie de fotodiodos Waters 2996 para determinar el grado de pureza de los tratamientos. Se empleó una columna Licrosphere 100 RP-18 de 250×4 mm (5 µm de tamaño de partícula) con un flujo de 0.9 ml/ min, y una fase móvil agua/ acetonitrilo con gradiente como se indica en el **Cuadro 4**. Los cromatogramas obtenidos por HPLC fueron analizados a diferentes longitudes de onda para la mejor identificación de la familia química a la cual pertenecen los compuestos presentes en las muestras.

**Cuadro 4:** Gradiente empleado en CLAR

| Tiempo (min) | H <sub>2</sub> O (%) | CH <sub>3</sub> CN (%) |
|--------------|----------------------|------------------------|
| 1            | 100.0                | 0.0                    |
| 2            | 95.0                 | 5.0                    |
| 3            | 95.0                 | 5.0                    |
| 4            | 70.0                 | 30.0                   |
| 20           | 70.0                 | 30.0                   |
| 21           | 50.0                 | 50.0                   |
| 23           | 50.0                 | 50.0                   |
| 24           | 20.0                 | 80.0                   |
| 25           | 20.0                 | 80.0                   |
| 26           | 0.0                  | 100.0                  |
| 27           | 0.0                  | 100.0                  |
| 28           | 100.0                | 0.0                    |
| 30           | 100.0                | 0.0                    |

#### 6.2 Pruebas biológicas

Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR (n = 9) con un peso 35 a 40 g, se manipularon bajo la ética de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron agrupados aleatoriamente en:

**Grupo Basal.** Animales sanos sin daño (animales que no recibieron el agente inductor de pérdida de la memoria) administrados solamente con una solución al 1 % de Tween 20 (100 µl/10 g) vía oral (v.o.).

Todos los demás grupos recibieron el estímulo químico para deterioro cognitivo, que fue la escopolamina

(ESC), a 0.15 y 1.5 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) y su respectivo tratamiento.

**Grupo control negativo (VEH):** Sólo recibió Tween 20 al 1% (100 µl/10 g) v.o.

**Grupo control positivo (GAL):** Galantamina a 4 mg/kg, v.o.

**Grupo Extracto (Db25) y (Db50)** Extracto diclorometánico (Db) a 25 y 50 mg/kg, v.o.

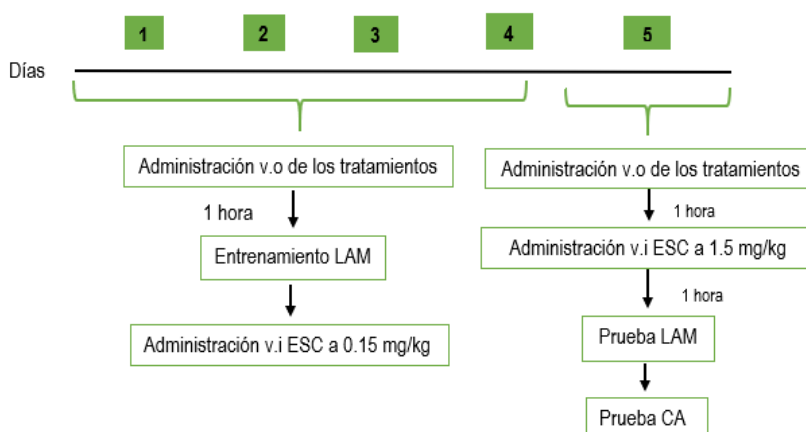
**Grupo DbC1F7:** 5 mg/kg, v.o.

**Grupo DbC1F8:** 5 mg/kg, v.o.

**Grupo DbC1F9-11:** 5 mg/kg, v.o.

### 6.2.1 Modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina

El modelo de inducción de deterioro cognitivo consistió en entrenar 4 días consecutivos a los ratones mediante la prueba de LAM administrando sus respectivos tratamientos v.o. y una dosis de 0.15 mg/kg v.i. de escopolamina al finalizar la prueba. En el quinto día se administraron los tratamientos v.o. y 1.5 mg/kg v.i. de escopolamina, posteriormente se realizó la prueba de LAM. Al finalizar se realizó la prueba conductual de campo abierto, y por ultimo los animales fueron sacrificados para la obtención del cerebro el cual se almaceno a -70° C para posteriormente realizar la prueba enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) (**Figura 10**).



**Figura 10:** Diagrama experimental del modelo de inducción del deterioro cognitivo. Laberinto acuático de Morris (LAM), Escopolamina (ESC), prueba de campo abierto (CA) vía intraperitoneal (v.i.), vía oral (v.o.).

### 6.2.2 Prueba de laberinto acuático de Morris

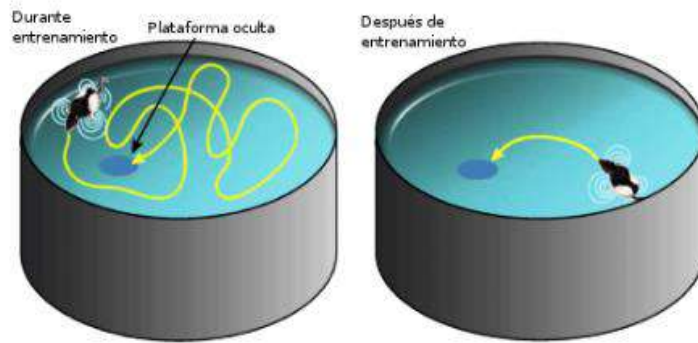
La prueba consistió en entrenar a los ratones durante 5 días en una piscina circular de 150 cm de diámetro x 50 cm de altura que contiene agua con colorante blanco, la cual está ubicada en una habitación con referencias visuales (figuras geométricas). La piscina está dividida en cuatro cuadrantes de acuerdo con los puntos cardinales (S, E, N, O).

La prueba consta de 5 días, donde los primeros 4 días los ratones son entrenados para encontrar la plataforma oculta que se encuentra escondida en el cuadrante O, antes de iniciar la prueba los animales son administrados con los diferentes tratamientos y una hora después se da inicio con la sesión de entrenamiento, al finalizar se les administro escopolamina (ESC) a 0.15 mg/kg. Cada ratón recibió 4 sesiones de entrenamiento por día durante cuatro días consecutivos, se les permite nadar 60s máximo por cuadrante para encontrar la plataforma, si en el primer intento no la encontraban eran conducidos directamente hacia la plataforma y se les dejaba en ella 30s. Al quinto y último día, se les administraron los tratamientos vía oral, 1 hora después se administró la escopolamina a 1.5 mg/kg y 1 hora más tarde la prueba fue realizada, cada ratón se sometió a una sesión de 60s, pero esta vez la plataforma fue removida (**Figura 11**) (Cocoma Ortega, 2017; Vicens *et al*, 2003).

El día de la prueba se grabó la sesión en video para su posterior análisis mediante el programa SMART V.3.0.03 Panlab Harvard Apparatus.

Se registraron los siguientes parámetros:

- La distancia de nado promedio en centímetros (distancia recorrida por el ratón en la búsqueda de la plataforma durante los 60s de evaluación).
- El tiempo de nado promedio en segundos sobre el cuadrante en el que se encontraba la plataforma en el periodo de entrenamiento (O).
- El tiempo de nado promedio segundos sobre el cuadrante opuesto a la plataforma (E).



**Figura 11:** Laberinto acuático de Morris (Modificada de Cocoma *et al*, 2017).

### 6.2.3 Prueba de campo abierto (CA)

La prueba se realizó con la finalidad de descartar la excitabilidad del sistema locomotor de los roedores, se llevó acabo al final de la prueba de LAM. La prueba de CA consiste en una caja de acrílico 30 x 30 cm y sus paredes 15 cm de alto, dividida en 9 cuadrantes (**Figura 12**) donde el roedor se coloca en el centro y observa durante 5 minutos, los parámetros de numero de levantamientos verticales (LV) que corresponde al número en el que los animales se paran en sus patas traseras para intentar salir de campo y el número de cuadrantes visitados durante el tiempo de la prueba o cruces totales (CT) (Cocoma *et al*, 2016).



**Figura 12:** Caja de acrílico utilizada en la prueba de campo abierto (Modificada de Porras *et al*, 2018).

### **6.3 Técnicas espectroscópicas y espectrométricas para elucidación estructural**

Los compuestos aislados en forma pura se analizaron por procesos espectroscópicos (resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ ) y Carbono ( $^{13}\text{C}$ ), Heteronuclear simple quantum coherence (HSQC), Heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) y Correlated spectroscopy (COSY) y espectrometría de masas para su correspondiente elucidación estructural.

### **6.4 Análisis estadístico**

Los resultados de los modelos de deterioro cognitivo son mostrados en gráficas y los datos ahí representados se sometieron a una prueba de ANOVA de una vía seguida de una post-prueba Dunnet con un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis se procesaron mediante el software Graphpad prism V. 8.0 (Graphpad Software Inc, California, E.U.A.).

## 7. Resultados

### 7.1 Obtención del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria*

El rendimiento del extracto y fracciones de interés biológico obtenidas mediante la separación cromatográfica se presenta en el **Cuadro 5**:

**Cuadro 5:** Rendimiento del extracto y fracciones farmacológicamente probadas.

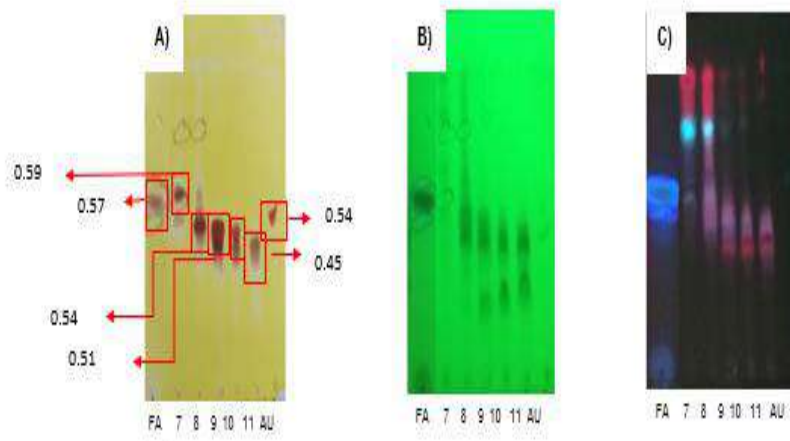
| Extracto y fracciones                    | Peso (g) | Rendimiento (%) |
|--|----------|-----------------|
| Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 14.7     | 2.5344          |
| DbC1F7                                   | 0.8748   | 5.9510          |
| DbC1F8                                   | 1.9388   | 13.1891         |
| DbC1F9-11                                | 1.0522   | 7.1578          |

### 7.2 Separación química de las fracciones de *Distictis buccinatoria*

Para la separación química y selección de las fracciones se basó en el perfil químico de la fracción activa (FA) del antecedente inmediato, así mismo fueron comparadas con CCF y se utilizó como estándar de referencia al ácido ursólico, esto nos permite determinar el perfil químico de los compuestos. También tomando en cuenta su factor de retención (FR) para determinar a qué tipo de compuestos pertenecen, es decir compuestos de baja, mediana polaridad y polares. La polaridad del compuesto será determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los compuestos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.

Se puede observar en el perfil químico de la placa en FN eluida en un sistema 95:5 diclorometano: metanol (**Figura 13 A**) el FR de la fracción DbC1F7, se localiza sólo unos mm arriba del AU por lo que se considera de menor o igual polaridad al AU y puede tratarse de compuestos de tipo terpeno. Sin embargo, de la fracción DbC1F8 y DbC1F9-11 los compuestos están localizados por debajo del FR del AU por lo que nos permite establecer que los compuestos de dichas fracciones tienen mayor polaridad que el AU, las placas fueron reveladas con sulfato cérico.





**Figura 13:** A) Perfil cromatográfico CCF FN de las fracciones DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11 de *Distictis buccinatoria*. Revelador: Sulfato cérico, FA: fracción activa antecedente, AU: estándar de referencia ácido ursólico. B) CCF  $\lambda= 254$  nm C) CCF  $\lambda= 365$  nm.

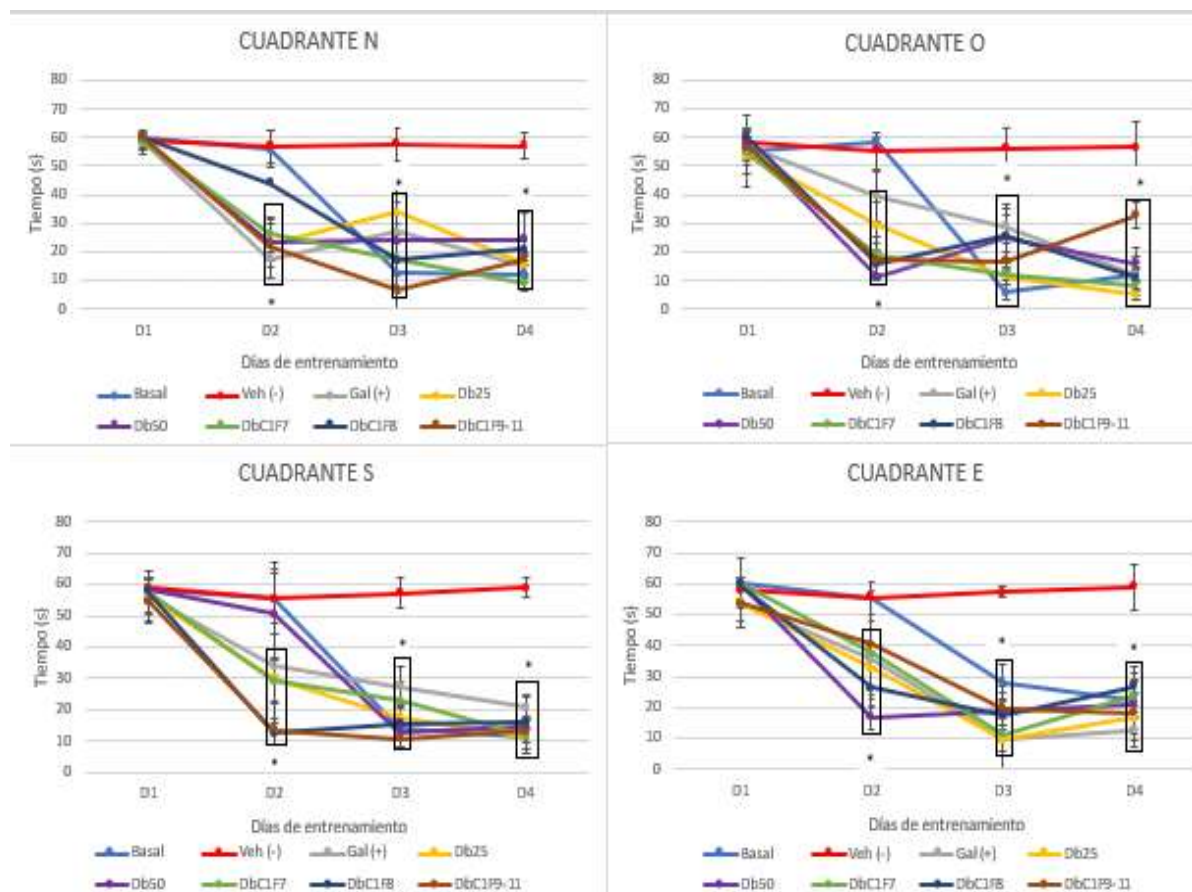
De acuerdo con la variedad química que presentan las fracciones DbC1F7, DbC1F8 y DbCF9-11 estas fueron seleccionadas para ser llevadas al modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina mediante prueba de LAM.

### 7.3 Efecto del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre el déficit cognitivo inducido con escopolamina en LAM

Todos los parámetros que fueron analizados durante el proceso de aprendizaje y memoria mediante LAM fueron comparados respecto al grupo control negativo VEH. Durante los 4 días de entrenamiento se analizó el tiempo (60s) promedio que les tomaba a los ratones localizar la plataforma desde los diferentes cuadrantes, donde al paso de los días los grupos extracto (Db25 y Db50), y fracciones de *Distictis buccinatoria* (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11) tardaban menos tiempo en localizar la plataforma de manera similar al grupo basal a diferencia del control negativo VEH que presentó un comportamiento casi lineal desde el día 1 al 4 de entrenamiento.

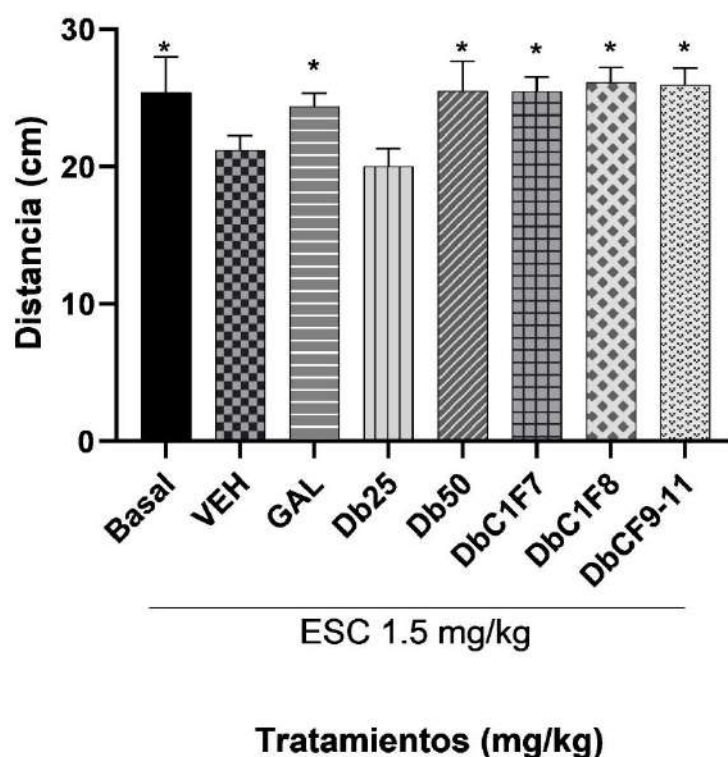
En la **Figura 14** podemos observar que en el día 1, el comportamiento de los ratones en todos los grupos es similar, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control negativo VEH ( $p>0.05$ ). Para el día 2 los grupos Db25, GAL y DbC1F7, DbC1F9-11 mostraron diferencia estadísticamente significativa en todos los cuadrantes respecto al VEH ( $p>0.05$ ). En los días 3 y 4 el grupo basal, GAL, Extracto (Db25 y Db50) y fracciones de *Distictis buccinatoria* (DbC1F7,

DbC1F8 y DbC1F9-11) localizan en menor tiempo la plataforma, presentando una diferencia estadísticamente significativa en todos los cuadrantes respecto al grupo control VEH ( $p > 0.05$ ).



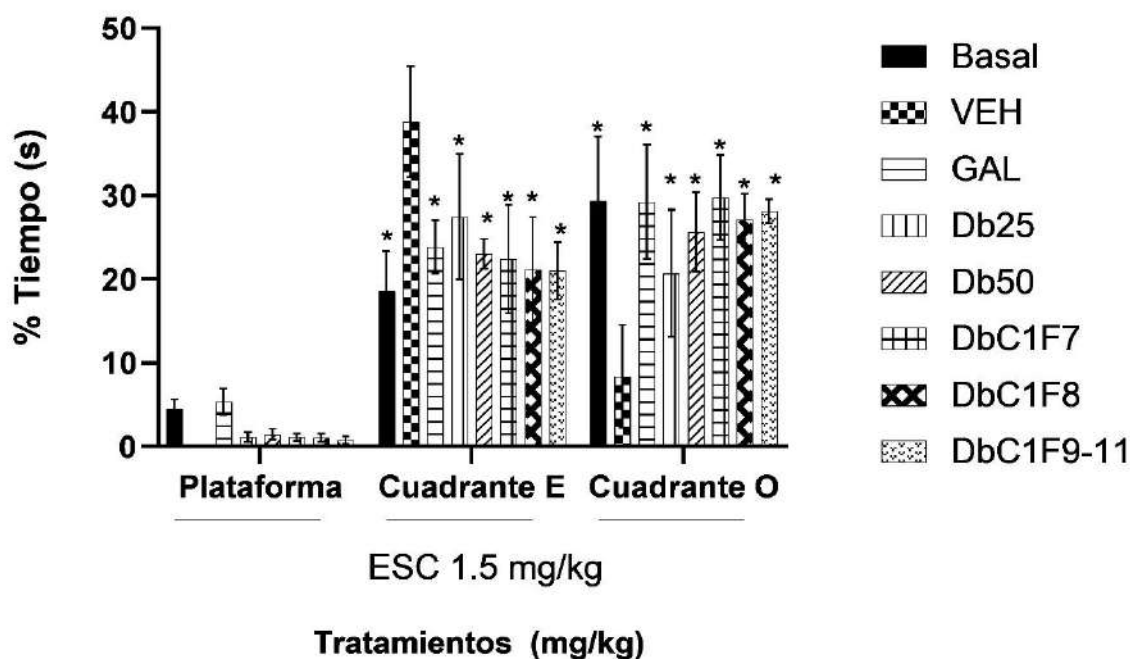
**Figura 14:** Efecto del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre el tiempo de recorrido en los diferentes cuadrantes (N, S, E, O) hasta la plataforma, de ratones con déficit cognitivo inducido con escopolamina, expuestos al LAM. Tratamientos experimentales, Extracto a 25 y 50 mg/kg (Db25 y Db50); Fracciones (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11); Galantamina control positivo 4 mg/Kg, GAL (+); Vehículo, control negativo, VEH. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5 \pm DE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el VEH.

En la **Figura 15** se observa la distancia recorrida por los ratones, en la búsqueda de la plataforma, previamente removida. Los grupos GAL, Db50 y fracciones de *Distictis buccinatoria* (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11) se comportaron de manera similar al grupo basal y presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control negativo VEH ( $p \leq 0.05$ ), aquí los ratones disminuyeron su distancia recorrida en búsqueda de la plataforma, por lo que esto nos indica que no recordaban dicha plataforma y que este comportamiento lo vemos reflejado de igual manera en los ratones del grupo Db25 que no presentaron una diferencia estadísticamente significativa.



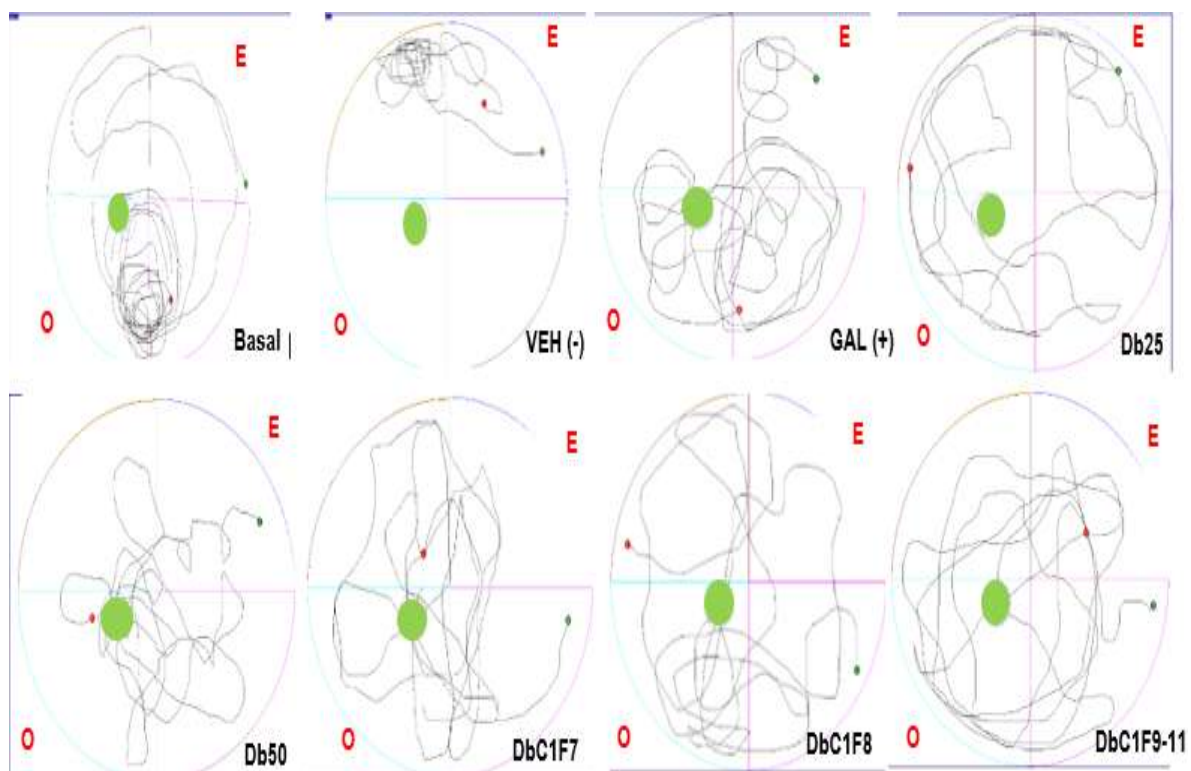
**Figura 15:** Efecto del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre la distancia recorrida, de ratones con deterioro cognitivo inducido con escopolamina en prueba de LAM. Tratamientos experimentales Extracto Db25 a 25 mg/kg, Extracto Db50 a 50 mg/kg; Fracciones DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11 a 5mg/kg; Galantamina control positivo 4 mg/Kg, GAL (+); Vehículo, control negativo, VEH. ANOVA post prueba Dunnet, \* $p < 0.05$  en comparación con grupo VEH ( $n=9 \pm DE$ ).

En el quinto día de experimentación, se midió el tiempo (s) de permanencia de los ratones en el cuadrante donde se encontraba la plataforma (O) y también en el cuadrante opuesto (E). Los datos se pueden observar en la **Figura 16**, GAL (+), Extracto (Db25 y Db50) y fracciones de *Distictis buccinatoria* (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11) permanecieron por más tiempo sobre el cuadrante O, un comportamiento similar al grupo basal, pero estadísticamente diferente al VEH ( $p \leq 0.5$ ). El tiempo en el cuadrante E, fue mayor para el grupo VEH, respecto al basal. Los tratamientos experimentales, disminuyeron el tiempo en dicha zona de la plataforma ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 16:** Efecto del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre tiempo de permanencia sobre el cuadrante O, cuadrante E y plataforma de ratones con deterioro cognitivo inducido con escopolamina en prueba de LAM. Tratamientos experimentales Extracto Db25 a 25 mg/kg, Extracto Db50 a 50 mg/kg; Fracciones DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11 a 5mg/kg; Galantamina control positivo 4 mg/Kg, GAL (+); Vehículo, control negativo, VEH. ANOVA post prueba Dunnet, \* $p < 0.05$  en comparación con grupo VEH ( $n=9 \pm DE$ ).

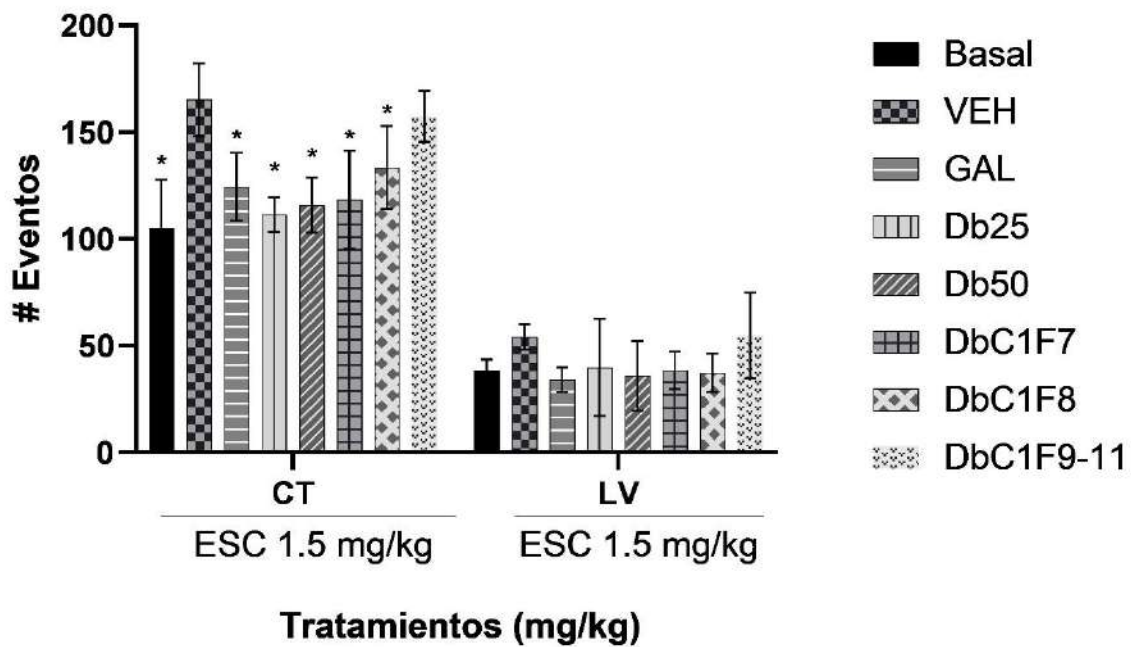
La trayectoria de los ratones durante el quinto día de la prueba de LAM se muestra en la **Figura 17** y se observa que los ratones de los grupos basal, Db50, y GAL (+) mantienen una trayectoria constante sobre el cuadrante O que es donde se localizaba la plataforma. El tránsito de los ratones que recibieron Db25, DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11, fue más disperso ya que si bien se movían sobre el cuadrante O, también lo hicieron sobre el E.



**Figura 17:** Trayectoria representativa de 1 ratón por grupo durante la evaluación en la prueba de LAM. Basal (sin daño), Control negativo (VEH), Control positivo (GAL+), Extracto *Distictis buccinatoria* 25 y 50 mg/kg (Db25 y Db50), Fracciones de *Distictis buccinatoria* a 5 mg/kg (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11).

#### 7.4 Efecto de *Distictis buccinatoria* en ratones expuestos al CA

Los ratones con daño inducido con ESC mostraron un incremento significativo en el número de CT respecto al grupo basal ( $p \leq 0.05$ ). En el caso de los LV los grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al basal ( $p > 0.05$ ) (Figura 18).

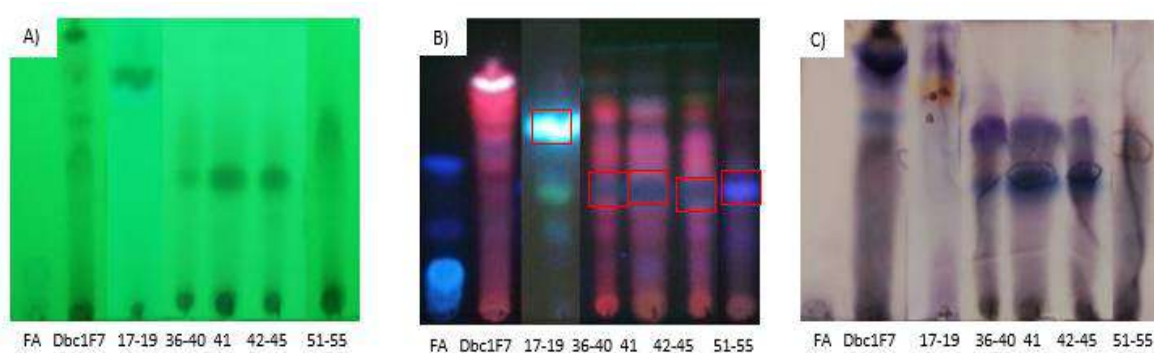


**Figura 18:** Efecto del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* sobre la conducta motora en cruces totales (CT) y levantamiento vertical (LV) de ratones con deterioro cognitivo inducido con escopolamina, en prueba de CA. Tratamientos experimentales, Extracto Db25 a 25 mg/kg, Extracto Db50 a 50 mg/kg; Fracciones DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11 a 5mg/kg; Galantamina control positivo 4 mg/Kg, GAL (+); Vehículo, control negativo, VEH (-). ANOVA post prueba Dunnet, \* $p < 0.05$  en comparación con grupo vehículo ( $n = 9 \pm DE$ ).

## 7.5 Caracterización química de las fracciones farmacológicamente activas

### 7.5.1 Fracción DbC1F7

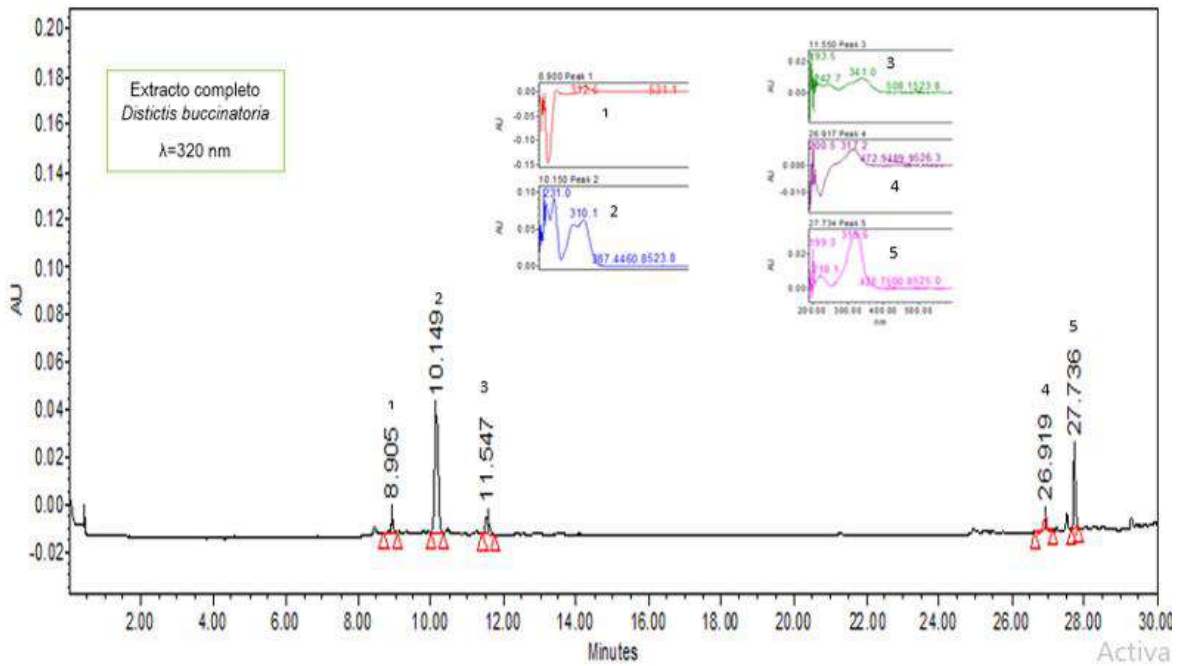
Como parte de la separación química e identificación de los compuestos de las fracciones farmacológicamente activas, se empleó un fraccionamiento de DbC1F7 donde se seleccionaron las fracciones DbC2F17-19, DbC2F36-45 y DbC2F51-55. Tomando en cuenta el perfil cromatográfico de la fracción activa del 2018 (FA), la fracción DbC2F17-19 son considerados compuestos de menor polaridad. Las fracciones DbC2F36-45 fueron agrupadas de acuerdo con la similitud de su perfil químico, centrándonos en el compuesto mayoritario de éstas, que es de mayor polaridad al igual que la fracción DbC2F51-55 (**Figura 19B**).



**Figura 19:** A) Perfil cromatográfico CCF FN de las fracciones DbC2F17-19, DbC2F36-45, DbC2F51-55 de *Distictis buccinatoria*. Revelador: 4- hidroxibenzaldehido, FA: fracción activa antecedente, Dbc1F7: Referencia. B) CCF  $\lambda= 254$  nm C) CCF  $\lambda= 365$  nm.

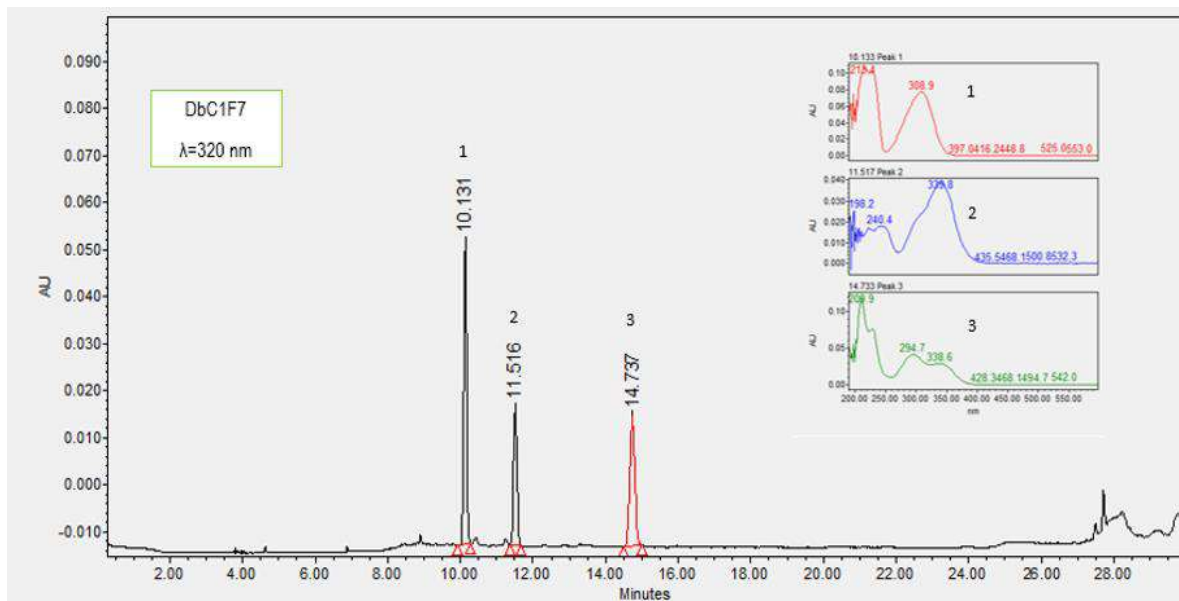
La caracterización química, por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), permitió la obtención de un cromatograma del extracto diclorometánico de *Distictis buccinatoria*, que se muestra en la **Figura 20**, los compuestos mayoritarios se encuentran a 8.905, 10.147, 11.546, 26.919 y 27.736 min, con un espectro UV característico de metabolitos tipo ácido hidroxicinámicos.





**Figura 20:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$  nm) correspondiente al extracto diclorometánico de *Distictis buccinatoria*; 1, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (8.905 min); 2, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 2 (10.149 min); 3, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 3 (11.547 min), 4, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 4 (26.919 min), 5, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 5 (27.736 min).

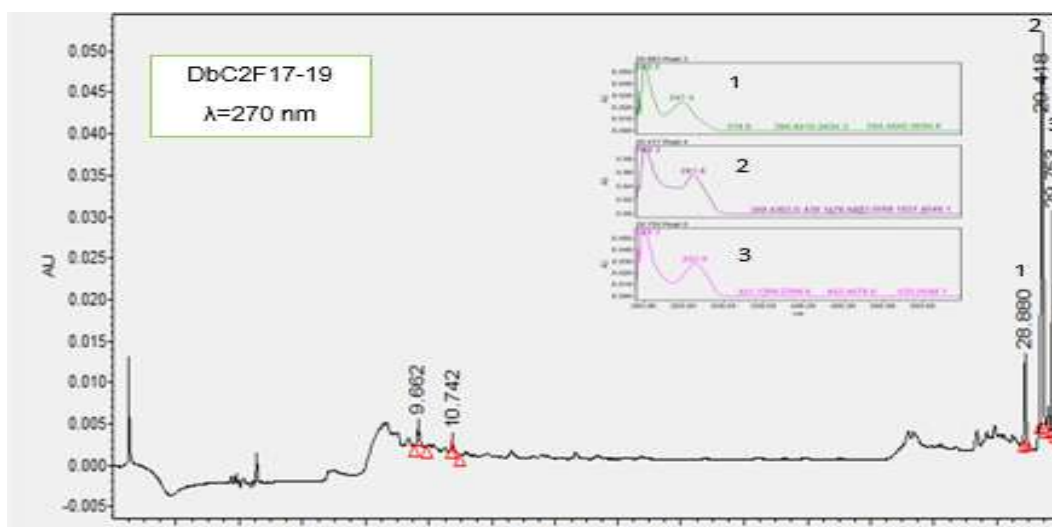
El análisis cromatográfico de DbC1F7 (**Figura 21**) indica la presencia de picos mayoritarios que representan compuestos en los tiempos de retención de 10.131, 11.516 y 14.737 min.



**Figura 21:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$  nm) correspondiente a la fracción DbC1F7; 1, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (10.131 min); 2, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 2 (11.516 min); 3, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 3 (14.737 min).

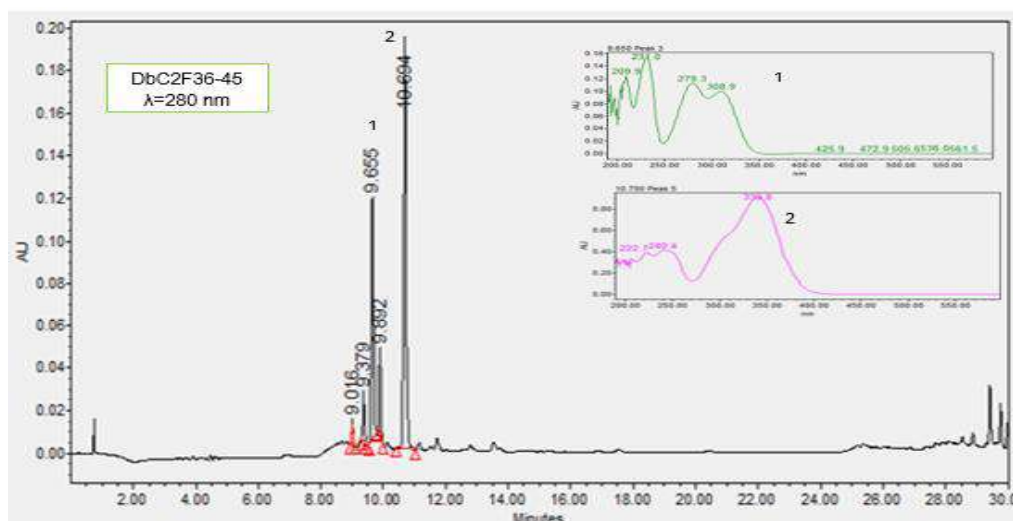


DbC2F17-19, DbC2F36-45 y DbC2F51-55, obtenidas de DbC1F7, tienen un perfil cromatográfico mostrado en la **Figura 22**; así para DbC2F17-19, destacan los compuestos con tiempo de retención de 28.880, 29.418 y 29.753 min, cuyos espectros UV son característicos de los terpenos.



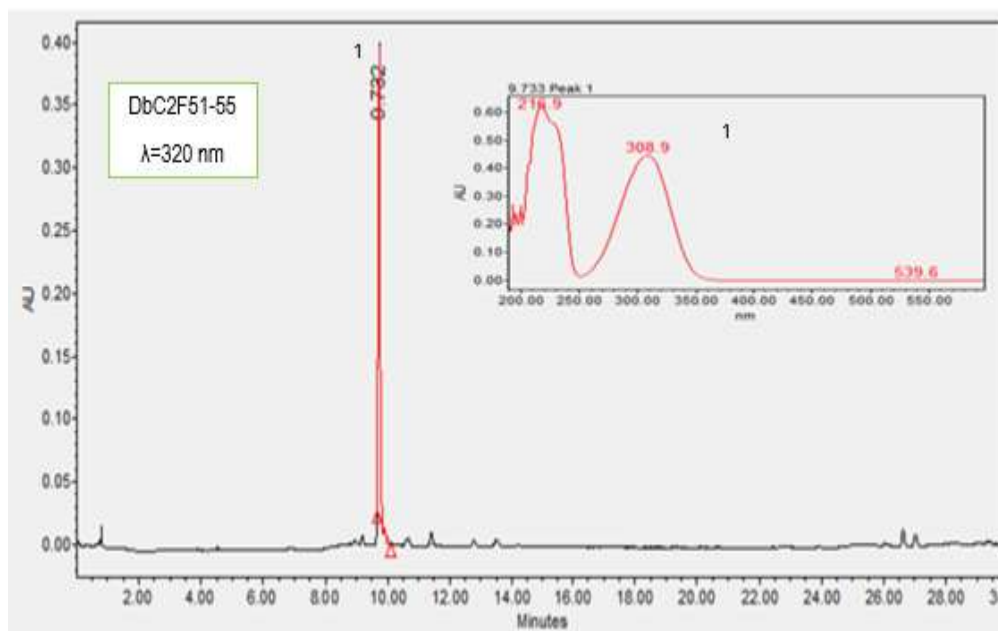
**Figura 22:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=270$  nm) correspondiente a la fracción DbFdF17-19; 1, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (28.880 min); 2, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 2 (29.418 min); 3, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 3 (29.753 min).

En la **Figura 23** podemos observar los picos mayoritarios con tiempos de retención de 9.655 y 10.694 min de la fracción DbC2F36-45.



**Figura 23:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=280$  nm) correspondiente a la fracción DbFdF36-45; espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (9.655 min); 2, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 2 (10.694 min).

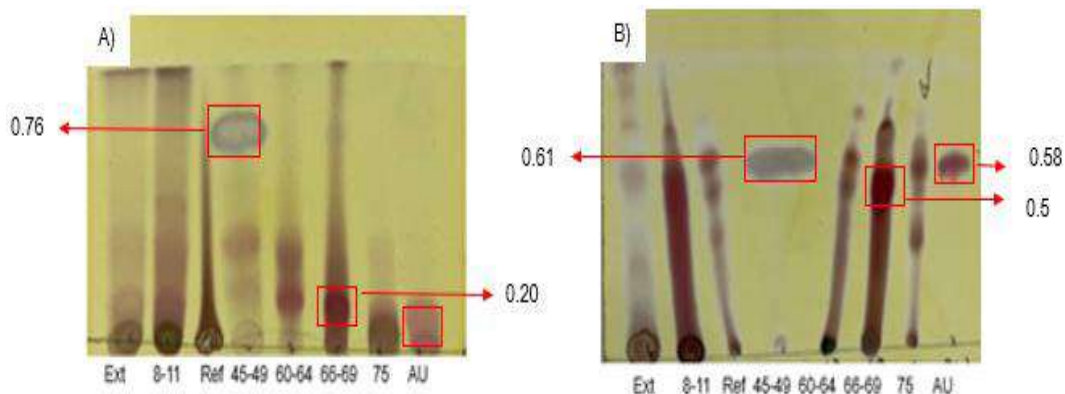
El cromatograma que se observa en la **Figura 24** corresponde a la fracción DbC2F51-55 se pueden observar un compuesto mayoritario con un tiempo de retención de 9.782 min.



**Figura 24:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$  nm) correspondiente a la fracción DbFdf51-55; espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (9.732 min).

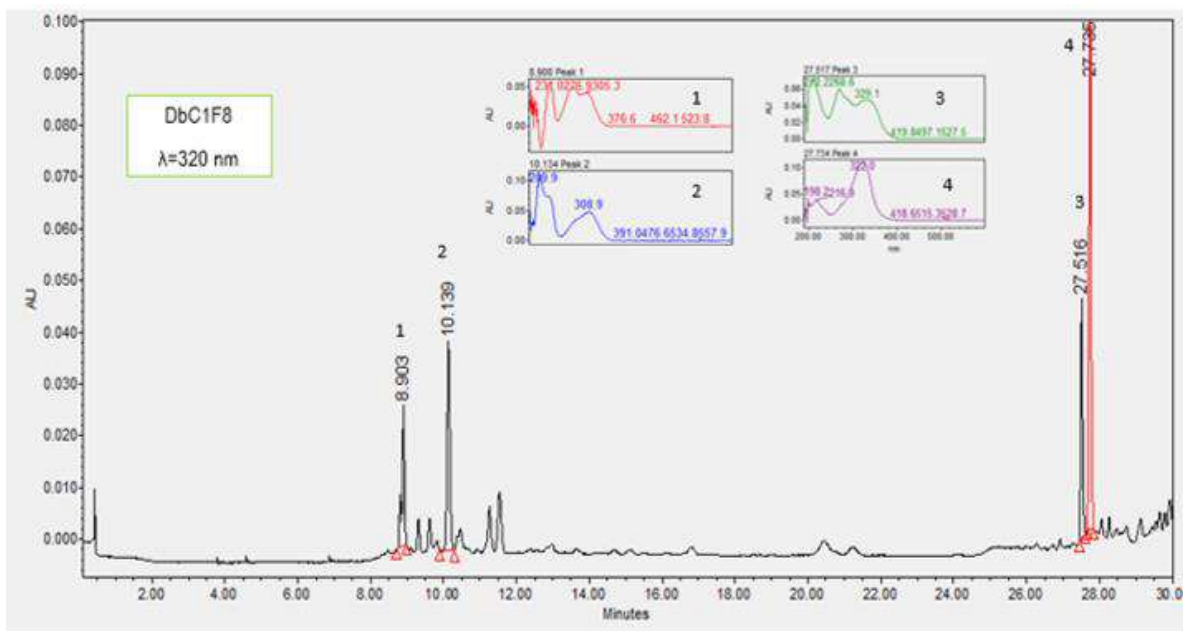
### 7.5.2 Fracción DbC1F8-11

En la **Figura 25 A** podemos observar el perfil cromatográfico de las fracciones DbC5F46-49 y DbC5F66-69, donde de acuerdo con su FR la fracción DbC5F45-49 se trata de compuestos más polares a comparación de la fracción DbC5F66-69 que tiene un FR menor, siendo un compuesto menos polar al igual que el ácido ursólico que este se queda en el punto de aplicación (RF=0). En el caso de la **Figura 25 B** se observa el perfil cromatográfico FN donde los FR son casi similares al ácido ursólico.



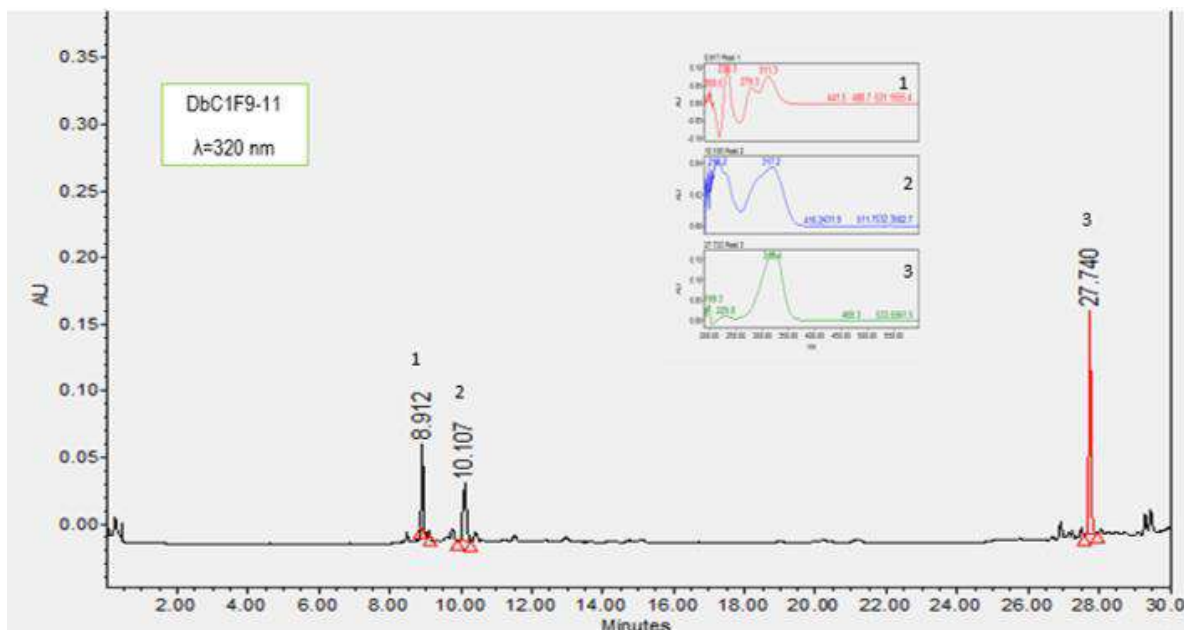
**Figura 25:** Perfil cromatográfico y sus valores de Rf en capa fina: Ext: extracto de *Distictis buccinatoria*; Fracción DbC1F8-11; Ref.: referencia (DbC4F69-81) y fracciones DbC5F45-49, DbC5F66-69. A) Placa de fase reversa, sistema 8:2 acetonitrilo- agua revelado sulfato cérico; B) Fase normal, sistema 95:5 diclorometano- metanol revelado sulfato cérico; AU= estándar de ácido ursólico.

Las fracciones fueron analizadas mediante CLAR y podemos observar en la **Figura 26** el cromatograma de DbC1F8 y los compuestos mayoritarios se encuentran en 8.903, 10.139, 27.516 y 27.735 min.



**Figura 26:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$  nm) correspondiente a la fracción DbC1F8; espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (8.903 min); 2, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 2 (10.139 min), 3, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 3 (27.516 min), 4, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 4 (27.736 min).

En la **Figura 27** se observa el cromatograma de la fracción DbC1F9-11, con compuestos que tienen los tiempos de retención de 8.912, 10.107 y 27.740 min, similar a DbC1F8.



**Figura 27:** Cromatograma CLAR ( $\lambda=320$  nm) correspondiente a la fracción DbC1F9-11; espectro UV correspondiente al tiempo de retención 1 (8.903 min); 2, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 2 (10.139 min), 3, espectro UV correspondiente al tiempo de retención 3 (27.516 min).

## 7.6 Elucidación estructural del compuesto contenido en fracciones activas

El compuesto aislado se obtuvo a partir de la fracción DbC5F45-49 proveniente de las fracciones farmacológicamente activas.

### 7.6.1 Análisis RMN de $^1\text{H}$ de la fracción DbC5F45-49

De las fracciones activas, se logró la separación de un compuesto, cuyo espectro RMN de  $^1\text{H}$  a 600 MHz, se muestra en la **Figura 28** y que de acuerdo con el experimento COSY se observan los experimentos vecinales (anexo 1) y podemos ver señales de:  $\delta$  6.24 (1H, d, 9.5, H-3),  $\delta$  7.63 (1H, d, 9.5, H-4),  $\delta$  7.36 (1H, d, 8.8, H-5),  $\delta$  6.84 (1H, dd, 2.5, 8.8, H-6) y  $\delta$  6.82 (1H, d, 2.2, H-8). Las correlaciones heteronucleares (HSQC) (Anexo 2) de estas señales permitieron identificar cada uno de los metinos y metilenos:  $\delta$  162.1 (C-2),  $\delta$  113.1 (C-3),  $\delta$  143.3 (C-4),  $\delta$  112.6 (C-4a),  $\delta$  128.7 (C-5),  $\delta$  112.6 (C-6),  $\delta$  162.9 (C-7),  $\delta$  100.9 (C-8),  $\delta$  156.0 (C-8a).

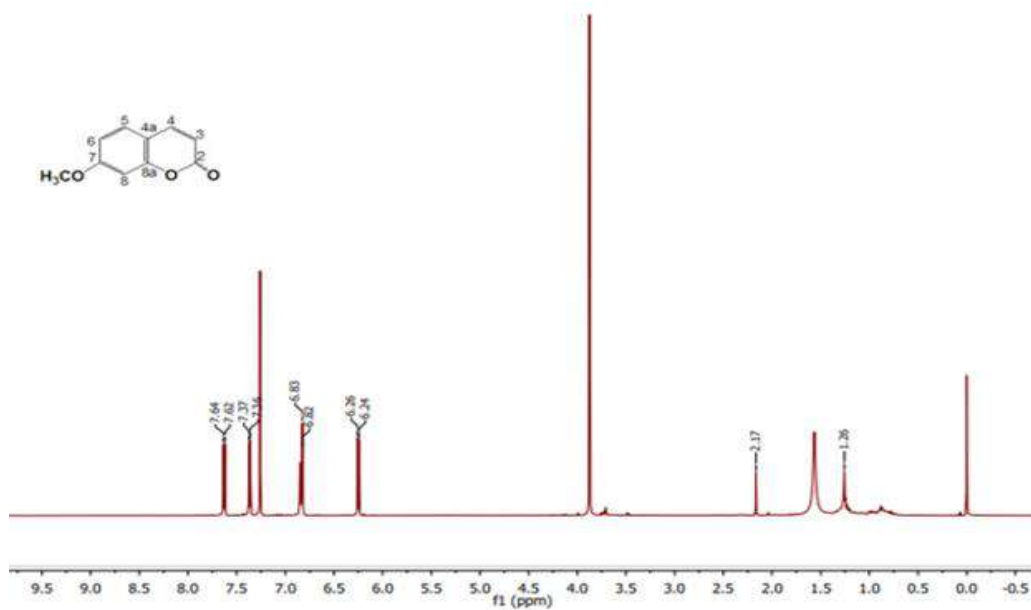


Figura 28: Espectro RMN de 1H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) de herniarina de la fracción DbC5F45-49

En la **Figura 29** se observa en los experimentos de 13C y las correlaciones de HMQC (anexo 3) de estas señales indicando la ubicación de los grupos metinos y metilenos.

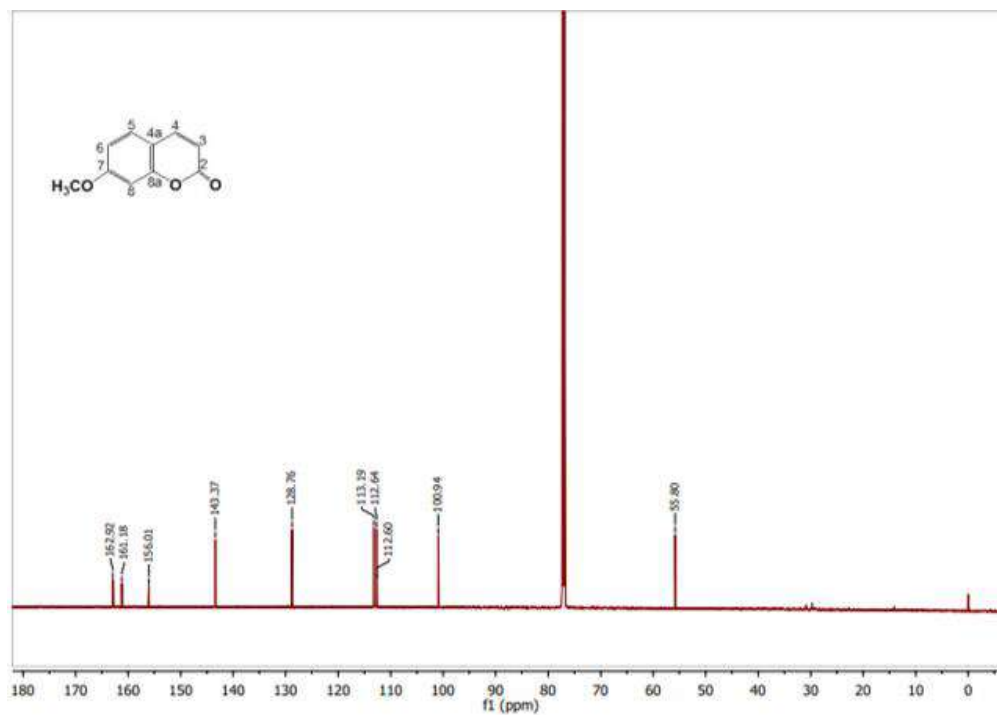
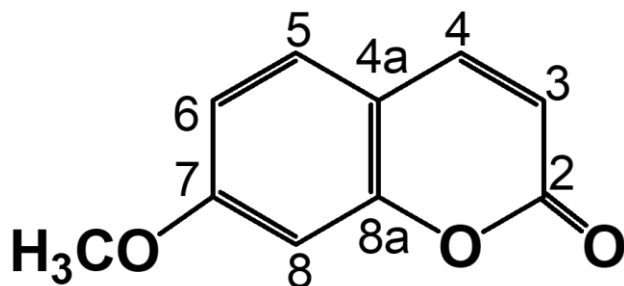


Figura 29: Espectro RMN de 13C (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) herniarina de la fracción DbC5F45-49

Las constantes de acoplamiento observadas permiten establecer que corresponde a una cumarina llamada **herniarina** y su estructura química se muestra en la **Figura 30 (Cuadro 6)**.

**Cuadro 6:** Valores de desplazamiento químico de protón y carbono ( $\delta$ , ppm) de herniarina

| Posición | $\delta$ $^1\text{H}$   | $\delta$ $^{13}\text{C}$ |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| 2        |                         | 162.1                    |
| 3        | 6.24 (1H, d, 9.5)       | 113.1                    |
| 4        | 7.63 (1H, d, 9.5)       | 143.3                    |
| 4a       |                         | 112.6                    |
| 5        | 7.36 (1H, d, 8.8)       | 128.7                    |
| 6        | 6.84 (1H, dd, 2.5, 8.8) | 112.6                    |
| 7        |                         | 162.9                    |
| 8        | 6.82 (1H, d, 2.2)       | 100.9                    |
| 8a       |                         | 156.0                    |



**Figura 30:** Estructura química de herniarina de la fracción DbC5F45-49

## 8. Discusión

Como se mencionó con anterioridad, los estudios químicos y farmacológicos para *Distictis buccinatoria* es escasa. El presente trabajo aporta información importante en el conocimiento de la planta en ambos tópicos. El antecedente inmediato de la especie fue en el 2015 en el que se mostró su actividad antiinflamatoria (Herrera *et al*, 2015), posteriormente un estudio farmacológico permite evaluar el efecto neuroprotector por su capacidad anti-neuroinflamatoria, antioxidante, nootrópica de la planta y de sus fracciones en un modelo de daño cerebral con lipopolisacárido (Porrás *et al*, 2018). Para avanzar en la investigación de la planta se tomó dicho trabajo como antecedente principal, abundando sobre el efecto nootrópico a través de provocar deterioro en la memoria por la administración de escopolamina (un antagonista colinérgico sobre los receptores muscarínicos).

Otro aporte en el trabajo antes mencionado fue el fraccionamiento químico, sin embargo, en él no fue posible la obtención de algún metabolito que enriqueciera el conocimiento químico. Considerando esto, de dicho trabajo se seleccionaron 3 fracciones (DbC1F7, DbC1F8, DbC1F9-11), que junto con el extracto fueron evaluados en el modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina.

La escopolamina es utilizada para inducir trastornos cognitivos en roedores, ya que penetra fácilmente en la barrera hematoencefálica y actúa sobre los receptores muscarínicos del neurotransmisor acetilcolina (ACh), el bloqueo de éstos lleva a una pérdida temporal de la memoria (Klinkenberg & Blokland, 2010), que puede medirse en diferentes pruebas conductuales como el laberinto acuático de Morris (LAM). En años recientes, se han estudiado los efectos de manipulaciones del sistema colinérgico sobre la adquisición y retención de tareas entrenadas en el LAM. Aquí también los anticolinérgicos producen una interferencia importante con estos procesos mnémicos, en vista de que el bloqueo de receptores colinérgicos produce pérdida de memoria, se espera entonces que la activación del receptor y con ello la facilitación de la transmisión colinérgica, mejoren la condición cognitiva (Quirarte & Prado, 2004), por ello el empleo de esta prueba en el presente trabajo. La cual fue diseñada para evaluar aprendizaje y la memoria espacial (Ramírez, 2018).

Los resultados en el presente trabajo indican que la escopolamina provoca el deterioro en ambos factores (memoria y aprendizaje), lo cual se observa al compararlo con los ratones sanos.

Durante los 4 días de entrenamiento en LAM, los ratones administrados con el extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria* al paso de los días localizaban en menor tiempo la plataforma en todos los

cuadrantes de manera similar al grupo basal a diferencia del control negativo VEH, esto se refleja como la mejoría del proceso de aprendizaje.

En el LAM, se ha demostrado que entre mayor sea el tiempo que los roedores pasan sobre el cuadrante donde la plataforma estaba ubicada, ya en la fase final del experimento, además de la distancia de recorrido hacia la plataforma se interpreta como un mayor aprendizaje (Tobar & Santamaría, 2018). En este sentido, se observó que los grupos que fueron tratados con el extracto o fracciones de *Distictis buccinatoria* presentaron dicho comportamiento, lo cual indica que los productos evaluados de esta planta influyen en la mejoría del proceso de aprendizaje en ratones con deterioro inducido con escopolamina.

No existen, como ya se ha mencionado, muchos estudios farmacológicos sobre *Distictis buccinatoria*, sin embargo, hay un estudio de una planta que pertenece a la misma familia (Bignonaceae), *Markhamia tomentosa* (Benth.) K. Schum, cuyo extracto acuoso a 50 y 200 mg/kg v.o. fue administrado por 10 días a ratas que recibieron escopolamina (0.7 mg/kg, ip) y fueron sometidas a los laberintos radial y Y; los autores observaron que el tratamiento mejora la memoria y disminuye el estrés oxidante en el hipocampo de rata, asumiendo que la actividad puede deberse a su efecto sobre la enzima AChE (Ionita *et al*, 2017).

No existen más estudios farmacológicos sobre la memoria para plantas de esta familia, no obstante, recorriendo la taxonomía de la planta, a continuación, se mencionan dos ejemplos de especies que pertenecen al orden de las lamiales, como *Distictis buccinatoria*. En 2018, Cuyan demostró que el extracto lipofílico de las semillas de *Salvia hispánica* administrados a grupos de ratas (*Rattus norvegicus*) fueron evaluados en el LAM, aumentaron su tiempo de permanencia sobre el cuadrante de la plataforma y permanecían poco en el cuadrante más alejando de la plataforma, sugiriendo que el extracto mejora el aprendizaje y la memoria (Cuyan & Leal, 2018). Así como en el 2006, Eidi y colaboradores realizaron un estudio para evaluar los efectos del extracto etanólico de hojas de *salvia officinalis* y su interacción con el sistema colinérgico sobre la retención de la memoria y aprendizaje en la prueba conductual de evitación pasiva. Se administró el extracto etanólico a 50 mg/kg v.i. y se sometió a la prueba conductual de evitación pasiva en ratas administradas con escopolamina. Se concluye que el extracto etanólico de *salvia officinalis* potenció la retención de la memoria y además tiene una interacción con el sistema colinérgico (Eidi *et al*, 2006).



Cabe señalar que el fármaco seleccionado como control positivo galantamina, es un alcaloide aislado de la especie *Galanthus nivalis*, y posee un doble mecanismo de acción actuando como agonista nicotínico, por lo que la neurotransmisión colinérgica se incrementa y con ello se revierte el efecto de la escopolamina y a su vez inhibe la acción de la acetilcolinesterasa (Loy & Schneider, 2006). Sin descartar otros modos de acción del extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria*, es posible que también esta planta actúe sobre los receptores de ACh debido a que fueron capaces de bloquear el efecto de escopolamina.

Los resultados de cromatografía indican la presencia de terpenos en el extracto y fracciones de *Distictis buccinatoria*. Existen estudios de la planta que muestran su riqueza en este tipo de compuestos tipo terpeno como: ácido 3-O- (E) -*p*-coumaroil ursólico, ácido 3-O- (Z) -*p*-coumaroil ursólico y el ácido ursólico. A dichos metabolitos secundarios se les atribuyen diversos efectos importantes, entre ellos un papel ecológico al actuar como mensajeros internos y externos, ya que actúan como agentes alelopáticos, repelentes o atrayentes en las interacciones planta-planta o planta-patógeno/herbívoro, estos compuestos no solo se encuentran en las plantas en forma libre, sino también como ésteres y conjugados glucosídicos llamados saponinas. A estos compuestos se les atribuyen una gran variedad de actividades biológicas tales como antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral y mejoradores de la memoria (Vázquez, 2015).

Chung y colaboradores en el 2001 reportaron que el ácido ursólico, el cual también se encuentra en *Distictis buccinatoria*, tiene un efecto inhibitor sobre AChE mediante un fraccionamiento secuencial del extracto etanólico de *Origanum majorana* (Chung *et al*, 2001). Por lo que se puede atribuir en parte, que el efecto nootrópico de *Distictis buccinatoria* sea a través de la inhibición de la enzima AChE con lo que aumenta la disponibilidad de la ACh y con ello la transmisión colinérgica por unirse a los receptores sobre los cuales la ESC ejerce su bloqueo (Balmus & Ciobica, 2017).

El comportamiento de los animales en el LAM está involucrando además la capacidad de éstos para usar el sistema motor y desplazarse a lo largo de la tina con agua, por lo que con la finalidad de descartar falsos positivos se llevó a cabo este ensayo. En el presente diseño experimental, la ESC se utilizó a 1.5 mg/kg, pero se ha demostrado que esta sustancia a dosis elevadas, como por ejemplo 20 mg/kg induce hiperactividad de ratas expuestas al campo abierto, lo que resulta del bloqueo de los receptores muscarínicos para acetilcolina (Jafarian *et al*, 2019). El efecto de la ESC sobre la conducta

de los ratones en CA no fue contrarrestado con los tratamientos derivados de *Distictis buccinatoria*, lo que indica que el efecto nootrópico de la planta no está enmascarado por el incremento motor.

Como se indica en los resultados, el análisis de DbC5F45-49 por cromatografía en columna, en capa fina, y en CLAR permitió el aislamiento de un compuesto tipo cumarina a la cual se le asignó el nombre de **herniarina**, después del estudio de la RMN por el Dr. Manases González.

Las cumarinas son lactonas, de origen natural o sintético, constituidas por un anillo de benceno condensado a un anillo  $\alpha$ -pirona, estas presentan fluorescencia a la luz UV de coloraciones entre azul, amarillo o morado. Debido a la gran variedad estructural de estas moléculas son muchas las propiedades farmacológicas asociadas a dicho anillo, entre otras la antimicrobiana, antiinflamatoria, antiespasmódica, antiviral, antihelmíntica, antioxidante, o como inhibidores enzimáticos (de Matos, 2013). Un estudio reciente del 2020, Monterrosas y colaboradores reportan actividad antiinflamatoria de la herniarina proveniente del extracto de hexano y acetónico de *Tagetes lucida*, para lo que usaron el ensayo de inflamación auricular inducido con un ester de forbol TPA (Monterrosas *et al*, 2020).

Respecto a herniarina o 7-methoxycoumarin, se ha demostrado que la administración oral de 7-metoxicumarina 1 mg/kg a ratas Wistar ovariectomizadas y con ESC a 2 mg/kg, las protege del deterioro cognitivo cuando son evaluadas en las pruebas de laberintos radial y en forma de Y (Zingue *et al*, 2018). Lo cual se sugiere puede ser debido a su actividad antioxidante, ya que la ESC produce la acumulación de peróxidos de hidrógeno al incrementar los niveles de GSH. Habría que señalar en este punto que el efecto antiinflamatorio de la herniarina puede contribuir también a su actividad nootrópica. Se ha reportado que el bloqueo de la neurotransmisión colinérgica genera alteraciones que son responsables de la disfunción en la memoria que se observa después del tratamiento con escopolamina. La actividad de la enzima AChE se incrementa considerablemente en el hipocampo, lo cual se ha relacionado con las anomalías en la neurogénesis de esta zona, ya que las neuronas son altamente sensibles al estrés oxidante y apoptosis, en este caso causado por la ESC, lo cual activa un proceso inflamatorio. Esta respuesta resulta en un deterioro sináptico disminuyendo la neurotransmisión colinérgica provocando diversas patologías en el cerebro como deterioro cognitivo, generando un impacto sobre la disminución en el rendimiento de la memoria.

Finalmente, se determinó que la herniarina está presente en todas las fracciones evaluadas, y otros compuestos probablemente derivados del ácido hidroxicinámico, además de terpenos. Así que todos en conjunto, podrían estar provocando el efecto nootrópico mediante una interacción de sinergismo.

## 9. Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados, se formulan las siguientes conclusiones:

- Se observó que el extracto y las fracciones de DbC1F7, DbC1F8 y DbC1F9-11 provenientes de *Distictis buccinatoria*, poseen actividad nootrópica.
- El extracto y fracciones de DbC1F7, DbC1F8 y DbC1F9-11 provenientes de *Distictis buccinatoria*, no fueron capaces de contrarrestar el incremento motor-inducido con ESC.
- El análisis químico permitió, la identificación de compuestos tipo terpeno, derivados hidroxicinámicos y cumarinas.
- Se llevó a cabo la elucidación estructural del compuesto tipo cumarina, la **herniarina**.

## 10. Perspectivas

- Realizar elucidación estructural de al menos un compuesto de la fracción DbC1F7.
- Llevar a cabo la evaluación del compuesto aislado en el modelo de deterioro cognitivo inducido con escopolamina en LAM.
- Realizar la prueba enzimática de AChE con la finalidad de demostrar su efecto nootrópico a nivel sistema colinérgico.

## 11. Literatura citada

- Adams M, Gmünder F, Hamburger M. 2007. Plants traditionally used in age related brain disorders- A survey of ethnobotanical literature. *J. of Ethnopharmacol* 111:363-381.
- Akhondzadeh, S, Abassi, S. 2006. Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *Am J of Alzheimer's Dis. Other Dementias* 21:113-118.
- Amor Andrés, M. S., & Martín Correa, E. (2003). Deterioro cognitivo leve. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 41(2), 169–172.
- Arango Lasprilla, J. C., Iglesias Dorado, J., & Lopera, F. (2003). *Características clínicas y neuropsicológicas de la enfermedad de Huntington : una revisión*. 37(8), 758–765.
- Bajo, T., Fernandez, Á., Ruiz, M., & Gómez, C. (2016). Memoria: estructura y funciones. *Mente y Cerebro: De La Psicología Experimental a La Neurociencia Cognitiv, March*, 167–197.
- Balmus, I. M., & Ciobica, A. (2017). Main Plant Extracts' Active Properties Effective on Scopolamine-Induced Memory Loss. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 32(7).
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales : Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales Alexis Bermúdez , María a . Oliveira-Miranda. *Interciencia*, 30(8), 453–459.
- Bernal, A., Gómez, D., López, S., & Acosta, R. (2013). *iNvEstigaciÓN Formativa imPlicacioNEs NEuroPsicolÓgicas, NEuroLÓgicas y Psiquiátricas EN uN caso dE iNtoxicaciÓN Por EscopolamiNa NEuroPsychological, NEurological aNd Psychiatric imPlicatioNs iN a casE oF PoisoNiNg scoPolamiNE*. 105–118.
- Bocanegra, Y., Trujillo-Orrego, N., & Pineda, D. (2014). Demencia y deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Parkinson: Una revisión. *Revista de Neurología*, 59(12), 555–569.
- Carretero Colomer, M. (2003). [Medicamentos de vanguardia] Travoprost. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 22(3), 150–152.
- Carrizales, M. de L. R., Rubio, M. V. G., Esqueda, F. J. L., & González, G. R. G. (2014). Demencias. In *Geriatrka* (Vol. 13, Issue 2).

- Chung, Y.-K., Heo, H., & Kim, E. (2001). *Efecto inhibitor del acidp ursolico purificado de O. mejorna*. 68–70.
- Cocoma Ortega, J. A., Barreto Flores, A., Bautista López, V. E., Ayala Raggi, S. E., & Daniel, P. de L. I. (2016). *CAMPO ABIERTO*. 38(122), 120–134.
- Cocoma Ortega, J. arturo. (2017). *Identificación de comportamiento en roedores*.
- Cuyan, R., & Leal, A. (2018). EFECTO DEL EXTRACTO LIPOFÍLICO DE LAS SEMILLAS DE *Salvia hispanica* L. (CHÍA) EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN *Rattus norvegicus*. In *Director* (Vol. 15, Issue 40).
- de Matos, M. J. (2013). *Cumarinas: Versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica*. In *Report*.
- Eidi, M., Eidi, A., & Bahar, M. (2006). Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition*, 22(3), 321–326.
- Estrada Castañeda, E., Palacios Can, F., & Rendón Rivera, L. (2011). *XXII CONGRESO CUAM-ACMor Desarrollo de biomaterial con aplicación terapéutico medicinal Centro Universitario Anglo Mexicano . Morelos*.
- González, S. L., & Frade, J. M. R. (2007). *Efecto neuroprotector de la galantamina y de su combinación con memantina , en un modelo de isquemia cerebral global transitoria en el jerbo*.
- Herrera-Ruiz, M., Rojas-Bibriesca, M. G., Nuñez, Z., Domínguez-Mendoza, B. E., Aviles-Folres, M., Fuentes-Mata, M., Tortoriello, J., & Zamilpa, A. (2015). Anti-inflammatory extracts and coumaroyl ursolic acid derivatives from *Distictis buccinatoria*. *International Journal of Pharmacology*, 11(7), 852–857.
- IMSS. (2012). *Guía de Referencia Rápida Diagnóstico y Tratamiento del Deterioro Cognoscitivo en el Adulto Mayor en el Primer Nivel de Atención Guía de Práctica Clínica GPC. Guía de Práctica Clínica, IMSS-144-08, 1–15*.
- Ionita, R., Postu, P. A., Beppe, G. J., Mihasan, M., Petre, B. A., Hancianu, M., Cioanca, O., & Hritcu, L. (2017). Cognitive-enhancing and antioxidant activities of the aqueous extract from *Markhamia tomentosa* (Benth.) K. Schum. stem bark in a rat model of scopolamine. *Behavioral and Brain*

*Functions*, 13(1), 1–13.

- Isabel, A., Luis, J., Cenicerros, S., & Patricia, E. (2017). Uso de plantas mexicanas con efecto inhibitorio sobre la enzima Acetilcolinesterasa como un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(4), 7–16.
- Jafarian, S., Ling, K. H., Hassan, Z., Perimal-Lewis, L., Sulaiman, M. R., & Perimal, E. K. (2019). Effect of zerumbone on scopolamine-induced memory impairment and anxiety-like behaviours in rats. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 5, 637–643.
- Jordán, J. (2001). Avances en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. *Gaceta Medica de Mexico*, 137(5), 487–488.
- Klinkenberg, I., & Blokland, A. (2010). La validez de la escopolamina como modelo farmacológico para el deterioro cognitivo: una revisión de estudios de comportamiento animal. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1307–1350.
- Lorenzo-Cáceres, J. M. S. de. (2016). *Las bignonias trepadoras cultivadas en españa* © 2016. 1–27.
- Loy, C., & Schneider, L. (2006). Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1.
- Marín M, D., Hans Carmona, V., Ibarra Q, M., & Gómez c, M. (2018). Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 50(1), 79–92.
- Martín Gómez, L. (2017). CUIDADOS DE ENFERMERÍA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON. *Journal of Clinical Nursing*, 44(4), 331–343.
- Milena, S., & Roa, C. (2013). *Efectos de la escopolamina a corto y largo plazo Effects of Short- And Long-Term Scopolamine Intoxication on Memory and Conceptual Skills*. 9(2), 335–346.
- Monterrosas, N., Maribel, H. R., Enrique, J. F., Rafael, B. P., Margarita, A. F., Macrina, F. M., Ivan, M. D., & Manasés, G. C. (2018). Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Natural Product Research*, 34(22), 3244–3248.
- Montevideo., C. de C. B. de la U. de. (2010). Observatorio de la salud. *Centro de Ciencias Biomédicas de La Universidad de Montevideo.*, 2(4), 68.

- Muñoz MJ, & Espinosa D. (2016). Deterioro cognitivo y demencia de origen vascular Cognitive impairment and vascular dementia Revisión Palabras clave Demencia vascular, deterioro cognitivo vascular, enfermedad vascular cerebral. *Deterioro Cognitivo Vascular Noviembre-Diciembre*, 17(6), 85–96.
- Navarrete, E., Prospero, O., Hudson, R., & Guevara, R. (2000). Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. *Gaceta Medica de Mexico*, 136(6), 573–584.
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J. M., Femenía, T., García-Gutiérrez, M. S., García-Payá, M. E., Leiva-Santana, C., & Manzanares, J. (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Revista de Neurología*, 47(3), 137–145.
- Nazir, M. S., Wahjoedi, B. A., Yussof, A. W., Abdullah, M. A., Singh, A., da Cunha, S., Rangaiah, G. P., Stephen, J. L., Periyasamy, B., Rummel, P., Grotjohn, T. A., Hove, G., Rego, A. S. C., Valim, I. C., Vieira, A. A. S., Vilani, C., Santos, B. F., Hermiati, E., Mangunwidjaja, D., ... Access, O. (2018). COMPARACIÓN DEL EFECTO NOOTRÓPICO EN BASE AL CONTENIDO DE VITAMINA E, OMEGA 3, OMEGA 6 Y OMEGA 9, EN ACEITE Y POLVO DE LINAZA ECUATORIANA (*Linum usitatissimum*) EN RATONES MUS MUSCULUS. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 192(4), 121–130.
- Organización Panamericana de la Salud. (2006). Trastornos de memoria. *Guía de Diagnóstico y Manejo*, 394–406.
- Orta-Salazar, E., Cuellar-Lemus, C. A., Díaz-Cintra, S., & Feria-Velasco, A. I. (2014). Marcaje colinérgico en la corteza cerebral y el hipocampo en algunas especies animales y su relación con la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 29(8), 497–503.
- Pérez- Garcia, G., Liy Salmeron, G., & Alfredo, M. (2006). RECEPTORES SEROTONÉRGICOS Y MEMORIA. *Revista Mexicana de Análisis de La Conducta*, 32(2), 241–269.
- Porras Dávila Sandra. (2018). *Efecto de Distictis buccinatoria sobre parámetros de daño asociados con Alzheimer experimental inducido por LPS*. Instituto Politecnico Nacional.
- Quirarte, G., & Prado, R. (2004). Efecto terapéutico de la experiencia incrementada: protección contra la amnesia experimental. In *International Journal of Clinical and Health Psychology* (Vol. 4, Issue 1).



- Ramírez, M. J. (2018). *Estudios funcionales en aprendizaje y memoria*. 55–65.
- Rodriguez-Escobar, J. ;, Del-Moral-Sánchez, J. ;, García-Ramos-García, R. ;, Matías-Guiu-Guía, J. ;, Gómez-Pastor, I. ;, Martín-Acero, T. ;, Carrasco-Marín, L. ;, & Mayor-de-Frutos, A. ; (2016). Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD. *Ministerio De Sanidad, Servicios Sociales E Igualdad*.
- Rojas, M. G., Navarro, V., Alonso, D., Ríos, M. Y., Tortoriello, J., & Román-Ramos, R. (2007). Antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of *Distictis buccinatoria*. *Pharmaceutical Biology*, 45(4), 289–294.
- Ruetti, E., Justel, N., & Bentosela, M. (2009). Perspectivas clásicas y contemporáneas acerca de la memoria. *Suma Psicológica*, 16(1), 65–83.
- Sanabria-castro, A. (2017). *Revisión Neurotransmisión Colinérgica Central : Aspectos Resumen Introducción*. 18(2), 76–87.
- Segovia Naranjo, E. luis. (2015). "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Ismene narcissiflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA." ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Solís, H., & Lopez- Hernández, E. (2009). Neuroanatomía de la memoria. *Arch Neurocién (Mex)*, 14(3), 176–187.
- Svoboda, J., Popelikova, A., & Stuchlik, A. (2017). Drugs interfering with muscarinic acetylcholine receptors and their effects on place navigation. *Frontiers in Psychiatry*, 8(NOV), 1–11.
- Tirapu-Ustárruz, J., & Muñoz-Céspedes, J. M. (2005). Memoria y funciones ejecutivas. *Revista de Neurología*, 41(8), 475–484.
- Tobar, A., & Santamaría, J. (2018). Aceite de Sacha Inchi como potenciador cognitivo. In *Director* (Vol. 15, Issue 40).
- Vázquez Rodríguez, E. (2015). *Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones*. 319.
- Ventura, A. L. M., Abreu, P. A., Freitas, R. C. C., Sathler, P. C., Loureiro, N., & Castro, H. C. (2010).

Sistema colinérgico: Revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 37(2), 74–80.

Vergara Serrano, Á. (2017). *Galantamina y Enfermedad del Alzheimer*.

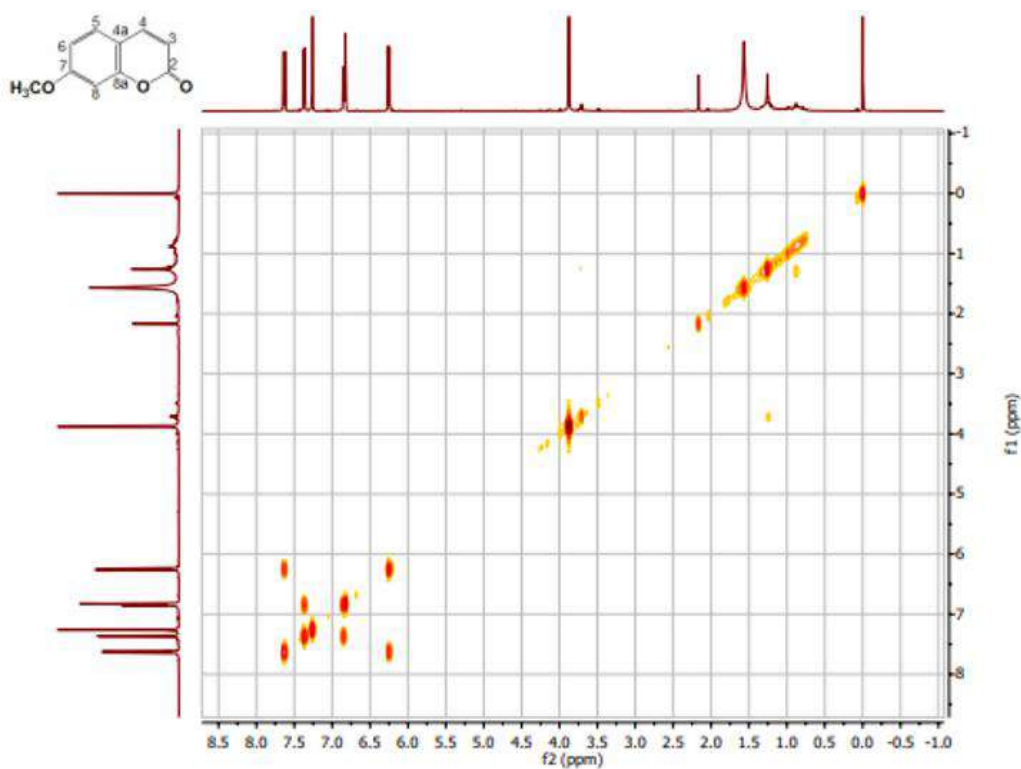
Vicens, P., Redolat, R., & Del Carmen Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15(4), 539–544.

Wong-guerra, M., & Pardo-andreu, G. L. (2015). *MODELOS ANIMALES NO TRANSGÉNICOS DE DEMENCIA . CONSIDERACIONES*. December.

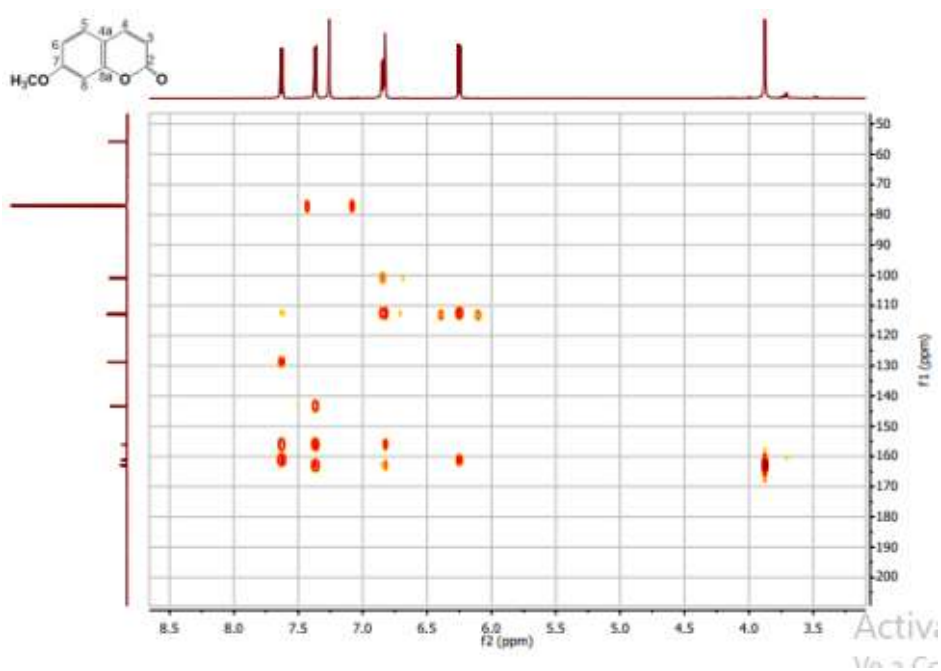
Zabala Gualtero, J. M., & Cadena Sanabria, M. O. (2018). Enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Carga del Cuidador: la importancia de cuidar al cuidador. *Revista Médicas UIS*, 31(1), 9–13.

Zingue, S., Foyet, H. S., Djiogue, S., Ezo'o Ezo'o, Y., Ngatanko Abaïssou, H. H., Fachagbo, P., & Njamen, D. (2018). Effects of *Ficus umbellata* (Moraceae) Aqueous Extract and 7-Methoxycoumarin on Scopolamine-Induced Spatial Memory Impairment in Ovariectomized Wistar Rats. *Behavioural Neurology*, 2018.

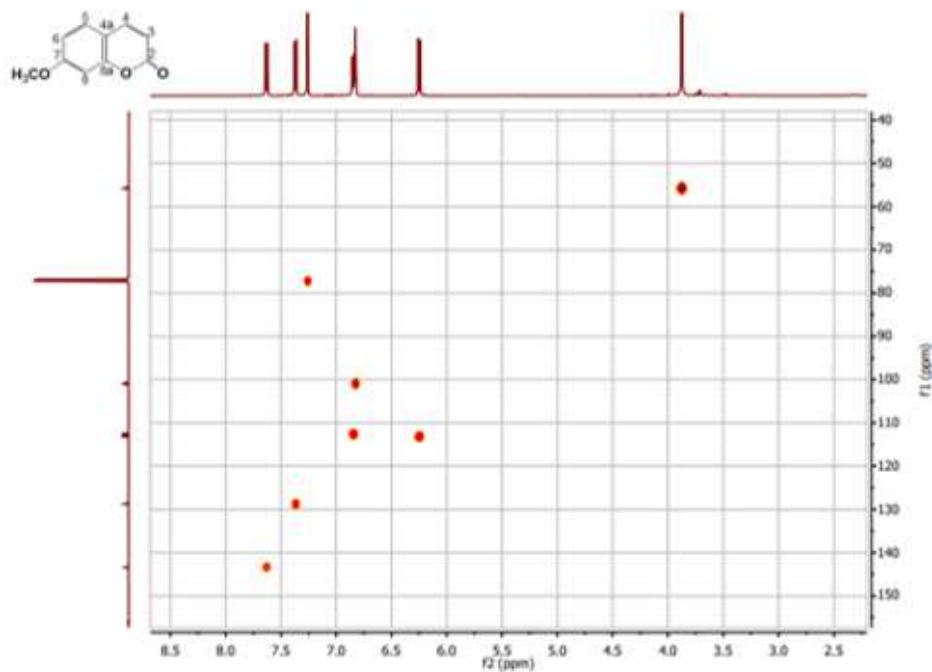
## Anexos



Anexo 1: Experimento COSY de DbC5F45-49 donde se observan las correlaciones vecinales



Anexo 2: Experimento HSQC de la fracción DbC5F45-49



Anexo 3: Experimento HMBC de la fracción DbC5F45-49

Cuernavaca, Morelos a 22 de marzo de 2022

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **MARÍA FERNANDA DÍAZ PATRICIO**, con el título del trabajo: **EFEECTO NOOTRÓPICO DE *Distictis buccinatoria* EN UN MODELO DE DETERIORO COGNITIVO INDUCIDO POR ESCOPOLAMINA EN RATÓN.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. NAYELI MONTERROSAS BRISSON

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-03-22 13:40:19 | Firmante**

jheLNWsfFnH+FBkUosVycF1ooZSWNo2le+KFxntToY3YNoQovD4B+4UjppBr70t9EPsnlu2ggWJRwcXShZIOwnOnNWpMXeA7oWoRK0rH/TUqYr+kssaVgtOtatJv9CYdMm1iyHI  
uqduqbuO2B/AIP17JhzdfBg4ufrMGxksGdnk9pKUaCiYwsygbZyeqTIsM7gRDh/HMSprSyNko4JfzXZLGPXjlbUNCJarKOYGY8Wn4MXbnJqZXC8emMSHJooT8zxloH8aPZ3ftqyJf  
2pxb+eKvFexof/gqncpYz09dZROixOBByImzVF4e/FyzR+ZSvN5OF7BnxEh8sE9YZILQcg==

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2022-03-22 14:26:59 | Firmante**

Pi2yKldZxcQWEQhaUCW1JFhKP09llnTRL+ngfYNbzgr808H0keSYXzrOj7tRFBjrwX8OawLPqA88SvkRpCPXcV1gjlP8N4B/acA777/anXi+oRTg9nsuyS9/t3ed72iMPE+AMt03FC  
3SnnPR9BZaZopwkDdTE+N4FYmQOBEh2DudLZHBn6o18lkFfaHeKeM+NxXUzCkgi6TgNh+Ja2lGwP+Q5Lyc9z1Q4ylNsWBWtr/WWW7duA87pOyC5Hg8Jnz0lxW1SEzXrkljZ34lJ  
9xj9UGH1KeShQZ56UhpZXBZAC9J8VIEO39PimO4kl071y/o6FdHP9RGwkMKBxVxhRHzw==

**DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2022-03-22 15:50:14 | Firmante**

RsfAjyWCYwRJ3ldTMsNrDRX9wTHS4LCuuyrgHvyycfyrW9Ly0+o4D5zYt+cbwA/JR+Cu1h7gAaa0KhoWUjuvcIbs8cagEJgVGejNatlZvesMgll+EZ20l3/WpTCMrhrRSj1W2PvJrv  
xxhcteCMEz7noVqC8C2VDWg3S0tDP0hwJMBhS3IO1Hw8KJAt+tveTKKqVLPnleKcdhvrP1oXilEQi5pH2h9DbHqTxiFC5J/vl2qTk4K+TvOTjX2WC/RK1XxQxT4ZBMejD14H69fa  
T69S/w6+if872AThGW0+Sf+Qp3JsCR6N2sZjo66dLzPt0OyoqJGG/AdSdaQf/6fZA==

**NAYELI MONTERROSAS BRISSON | Fecha:2022-04-07 09:20:44 | Firmante**

DhKEVXHH1IkDe5jleRv8En+/YQAnd8EhupmhzxPwctTWsQjdwrX3a116ivyQseguXopk9QjoOt7OImNdy44EfhLamtVKv9Jini9eSen744IVIQHhNSS71ifuZl0uqxaFdz5+B7DCB3j  
F/dOuuopF3RBul6l6u5ffW9zYQe6pCIL4dDDZiQs3PfatB6sCnOam8/4A/BI+7NmLF9CR2S24kcQ+DGj3nXfBwtv/fStZ3hEdY3DT6MNqllcGxo0GRYQ+qCfsS2q+j66Onc0hg5ulfHii  
8D68WijapxV/1ntyw99wcpWHo+9YveNWVxOSYSdtf3fifaUw54CIFNAILJA==

**JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER | Fecha:2022-04-26 11:51:58 | Firmante**

hiYKHdZQDCdWT78l3ym1dZLiZhGhJsybjZOxX321zwhRaxqfBN6MEJFmY1mLx8AJxDjpULObMUemeX29khGDkVPapzpbk632Gh0u4AdjesQT3VJaKWAf+CaoLvcjuwoakMT  
4DzhgkObk0G674xemuVKHtFtpVEcrbyG+tP5725vHD4Vxv1rnNVRP9/L4Kr0WtN/vmIR2iV5Cuxyb1qR27SwSLOBNJKVgzo+zZOANERQSVZrhfHz5zD189OvFwyyY43QZrES6P  
FE/wKzH/gqnVokHGN8VK9UfUvq+MhhVWhjau4PdBeCf0kKYGGCmZ3AdriYvKQICuMe3qcNFPgsg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Lcyqa3HTP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1PC6rZpaGdJHcvFUI3M19tSxk3Cb9jdc>

