



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINEUROINFLAMATORIO
DE *Tagetes lucida* EN UN MODELO DE DAÑO INDUCIDO
CON LIPOPOLISACÁRIDO**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RAFAEL BAHENA PÉREZ

CO-DIRECTORAS

DRA. NAYELI MONTERROSAS BRISSON

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis directoras de tesis, Dra. Nayeli Monterrosas Brisson y Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz, por todo el apoyo que me brindaron durante la realización del proyecto de tesis y posteriormente, durante la redacción de esta, su dedicación y paciencia fueron fundamentales para mi crecimiento personal y académico durante el tiempo que tuve el honor y placer de trabajar bajo su tutela. Agradezco la oportunidad que me brindaron de pertenecer a un grandioso equipo que compartió conmigo su pasión por la investigación y su experiencia y que, a su vez, motivó la expansión de mis horizontes.

Agradezco también a mis familiares y amigos por todo su apoyo a lo largo de mi vida, por motivarme a siempre superarme, a no rendirme y conquistar las metas que me propongo.

I. ÍNDICE

II. ÍNDICE DE TABLAS	III
III. ÍNDICE DE FIGURAS	IV
IV. ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	V
RESUMEN:.....	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	4
2.1. Neuroinflamación.....	4
2.2. Enfermedades neurodegenerativas	4
2.3. Células de la glía	5
2.4. Moléculas neuroinflamatorias.....	6
2.5. Barrera hematoencefálica.....	11
2.6. Tratamientos farmacológicos	12
2.7. <i>Tagetes lucida</i>	13
2.7.3. Usos de <i>Tagetes lucida</i> en la medicina tradicional.....	16
2.7.4. Estudios farmacológicos.....	17
2.8. Modelo experimental de inflamación con TPA.....	17
2.9. Modelo de neuroinflamación inducida con LPS	18
2.10. Modelos conductuales	20
3. Justificación	23
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	25
5.1. Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos particulares	25
6. Materiales y métodos	26
6.1. Material vegetal y obtención del extracto	28
6.2. Aislamiento y purificación de compuestos	28
6.3. Elucidación estructural de los compuestos obtenidos	38
6.4. Ensayos farmacológicos.....	39

6.5.	Material de laboratorio y reactivos.....	39
6.6.	Inflamación auricular inducida con TPA.....	39
6.7.	Neuroinflamación-inducida con LPS.....	41
6.8.	Conducta motora espontánea en campo abierto (CA).....	43
6.9.	Cuantificación de citocinas a través del método de ELISA.....	43
7.	Análisis estadístico.....	44
8.	Resultados.....	45
8.1.	Efecto de <i>Tagetes lucida</i> sobre inflamación aguda inducida con TPA.....	45
8.2.	Elucidación estructural de los compuestos aislados de <i>Tagetes lucida</i>	47
8.3.	Efecto de <i>Tagetes lucida</i> en ratones con neuroinflamación-inducida con LPS ...	49
8.4.	Efecto de <i>Tagetes lucida</i> sobre concentración de citocinas en ratones con neuroinflamación inducida con LPS.....	50
9.	Discusión.....	56
10.	Conclusiones.....	64
11.	Perspectivas.....	65
12.	Referencias bibliográficas.....	66

II. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fármacos que se prescriben habitualmente para tratar demencias y manifestaciones de la neurología cognitiva	13
Tabla 2. Fracciones obtenidas en la columna 1	33
Tabla 3. Fracciones obtenidas en la columna 2	34
Tabla 4. Fracciones obtenidas en la columna 3	35
Tabla 5. Fracciones obtenidas en la columna 4	35
Tabla 6. Fracciones obtenidas en la columna 5	36
Tabla 7. Fracciones obtenidas en la columna 6	36
Tabla 8. Fracciones obtenidas en la columna 7	37
Tabla 9. Fracciones obtenidas en la columna 8 y 9	37

III. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig 1. Principales constituyentes de la BHE	12
Fig 2. Morfología de <i>T. lucida</i>	15
Fig 3. <i>T. lucida</i>	15
Fig 4. Ubicación geográfica de <i>T. lucida</i>	16
Fig 5. Diagrama de flujo del trabajo fitoquímico-farmacológico	26
Fig 6. Diagrama de flujo de estrategia experimental para la evaluación de la actividad antineuroinflamatoria	27
Fig 7. Resumen de columnas y compuestos extraídos durante el fraccionamiento químico del extracto hexánico de <i>T. lucida</i> .	29
Fig 8. Datos de C13 y H+ de elucidación estructural del extracto hexánico de <i>T. lucida</i>	38
Fig 9. Procedimiento de modelo de inflamación auricular con TPA	41
Fig 10. Fotografías de ratones con neuroinflamación sometidos a la prueba de campo abierto	43
Fig 11. Resultado de evaluación de edema auricular con TPA	46
Fig 12. Resultado de índice de peso para bazo y cerebro de ratones con neuroinflamación	49
Fig 13. Resultado de concentración de IL-1 β en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación	51
Fig 14. Resultado de concentración de IL-6 en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación	52
Fig 15. Resultado de concentración de IL-10 en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación	53
Fig 16. Resultado de concentración de TNF- α en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación	54
Fig 17. Resultados de comportamiento exploratorio y conducta motora en CA	55

IV. ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA UTILIZADA

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
Aβ	β -Amiloide	IFN-γ	Interferón- γ
ACh	Acetilcolina	IL	Interleucina
AChE	Acetilcolinesterasa	i.p.	Intraperitoneal
ApoE	Apolipoproteína E	LDL	Lipoproteínas de baja densidad
BHE	Barrera hematoencefálica	Li	Latencia inicial
CA	Campo abierto	LPS	Lipopolisacárido
ChEI	Inhibidores de colinesterasas	Lr	Latencia de retención
COX-2	Ciclooxigenasa-2	O.D.	Oreja derecha
CT	Cruces totales	O.I.	Oreja izquierda
EA	Enfermedad de Alzheimer	OMS	Organización Mundial de la Salud
ERN	Especies reactivas de nitrógeno	PPA	Proteína precursora amiloide
ERO	Especies reactivas de oxígeno	RMN	Resonancia magnética nuclear
EP	Evitación pasiva	SNC	Sistema nervioso central
EV	Elevamientos verticales	TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés Food drug administration)	TIAc	Extracto acetónico de <i>T. lucida</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	TIH	Extracto hexánico de <i>T. lucida</i>
HPA	Eje hipotálamico-pituitario-adrenal	TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
		TPA	12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato
		v.o.	Vía oral

Resumen:

El incremento en la incidencia de enfermedades asociadas a la neuroinflamación va en aumento, por lo que este mecanismo resulta ser un blanco en la búsqueda de nuevas terapias que ayuden a controlarlo, por lo que las plantas medicinales y los productos derivados de su metabolismo secundario, resultan ser soluciones terapéuticas factibles, en las que se pretende también un menor número de efectos adversos que los tratamientos actuales.

Tagetes lucida es un objetivo de estudio farmacológico, ya que es una planta cosmopolita, endémica de México y Guatemala, ampliamente distribuida dentro del territorio nacional, utilizada desde épocas pre-coloniales por los antiguos pobladores mesoamericanos principalmente como hierba ritual. Con el paso de los años, se le han ido atribuyendo una gran cantidad de usos en la medicina tradicional mexicana, principalmente para tratar padecimientos relacionados con enfermedades ligadas a la cultura, resaltando aquellas sobre sistema nervioso central. Las partes aéreas de *T. lucida* son frecuentemente utilizadas en infusiones para tratar afecciones como “susto”, “nervios” y ansiedad, también es útil para tratar distintos padecimientos relacionados con problemas inflamatorios. En el presente trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria y antineuroinflamatoria de *T. lucida* utilizando un ensayo de inflamación local y un modelo de neuroinflamación inducida.

Para lograr el objetivo, se realizó una extracción hexánica y una extracción acetónica de las partes aéreas de *T. lucida*. Se analizó el efecto in vivo a través de la inducción de edema auricular con TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) (1 mg/oreja), el extracto hexánico (TIH) provocó una inhibición del edema del 92%, por lo que fue usado como materia para el fraccionamiento químico, del cual se logró el aislamiento de 5 compuestos tipo cumarinas: 7-Isopreniloxicumarina (C1), 7-Metoxicumarina (C2), 7-Isoprenil-6-metoxicumarina (C3), 6,7,8-Trimetoxicumarina (C4) y 6,7-Dimetoxicumarina (C5). Cuya actividad antiinflamatoria también fue analizada sobre el edema local, resultando que C1 con 81 % y C2 con el 50% de

actividad inhibitoria fueron los más activos. TIH (10 mg/kg), C1 y C2 (ambos a 2 mg/kg) y meloxicam (5 mg/kg, control) fueron probados en el modelo de neuroinflamación inducida mediante la administración i.p. de LPS (25 µg/kg) de *E. coli*. El experimento duró 14 días, durante los 7 primeros se administró el LPS, al día 8 se inició la aplicación de los diferentes tratamientos por 7 días más. En el último día, los animales fueron sometidos, primero, al ensayo de campo abierto (CA), para medir su conducta motora a través de las variables de cruces totales (CT), elevamientos verticales (EV) y acicalamientos (G); y posteriormente sacrificados para la extracción de cerebro y bazo, los cuales fueron pesados y usados para la cuantificación de la citocina antiinflamatoria IL-10 y pro-inflamatorias, IL-1β, IL-6 y TNF-α, mediante la técnica de ELISA.

Los tratamientos provenientes de *T. lucida* disminuyeron significativamente la actividad motora espontánea; además redujeron la concentración de citocinas pro-inflamatorias. TIH y meloxicam incrementaron la citocina antiinflamatoria (IL-10), mientras que C1 y C2 la redujeron.

Los tratamientos derivados de *T. lucida* (TIH, C1 y C2) poseen capacidad antiinflamatoria y antineuroinflamatoria, probablemente actuando como moduladores de la respuesta inmune, al modificar la concentración local de citocinas. Los resultados indican un probable efecto sedante del extracto y los compuestos en ratones con neuroinflamación inducida (TIH, C1 y C2) a través de la prueba en CA.

1. Introducción

El sistema nervioso central (SNC) responde a diferentes estímulos de daño, como el trauma, infecciones, daño cerebrovascular y neurotoxinas, a través de la respuesta inflamatoria. Este tipo de inflamación aguda es de corta duración y su función es la de protección, sin embargo, cuando ésta no logra neutralizar el daño, la respuesta se prolonga a un estado neuroinflamatorio crónico por la acumulación sostenida de mediadores proinflamatorios que resultan ser neurotóxicos, proceso que forma parte de todas las enfermedades neurodegenerativas.

Dentro de los principales mediadores celulares de la inflamación a nivel central, se encuentra la microglía que como parte de la respuesta inmune innata en SNC, responde ante el estímulo de daño liberando una variedad de mediadores químicos, entre ellos las citocinas. Estas moléculas proteicas comprenden un grupo diverso, como la interleucina (IL)-6, IL-1 β y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que son potentes sustancias proinflamatorias. Mientras que la IL-10 regula a la baja el proceso y es considerada anti-inflamatoria.

De esta manera, la neuroinflamación está asociada a cambios patológicos en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, provocando cambios conductuales diversos. Existen diferentes modelos experimentales, cuya finalidad es tratar de reproducir la neuroinflamación en roedores, por ejemplo, el de la administración sistémica de lipopolisacárido (LPS). En el presente proyecto se propuso el estudio del efecto de los extractos y compuestos de *Tagetes lucida* sobre la inflamación local, como prueba de screening para determinar aquellos con mayor actividad antiinflamatoria y posteriormente de manera sistémica. Para la inflamación local, se utilizó una prueba de edema auricular inducido con in éster de forbol (TPA) en la búsqueda de los mejores tratamientos derivados de la planta y posteriormente sobre la neuroinflamación-inducida con LPS en ratones, se midió la inflamación a través de la cuantificación cerebral y esplénica de citocinas, además de medir la conducta motora.

2. Antecedentes

2.1. Neuroinflamación

El proceso neuroinflamatorio hace referencia a la inflamación del SNC, que se presenta como medida protectora al detectar un agente extraño en dicha zona. Los principales tipos de células encargadas de llevar a cabo la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central son los astrocitos y las células microgliales (Díaz *et al.*, 2012). Estas células son consideradas como el “macrófago del cerebro” y son capaces de realizar fagocitosis y presentación de antígenos, lo cual la convierte en la célula representativa del sistema inmune en el SNC (Morales *et al.*, 2010).

La neuroinflamación presente en las enfermedades neurodegenerativas, tanto agudas como crónicas son dadas como respuesta a una lesión o una alteración del SNC y consiste en una respuesta inmune innata, la cual active a las células de la glía, las cuales sintetizan y liberan citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, proteínas de la cascada del complemento, especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN). Regularmente, esto ocurre bajo un proceso perfectamente regulado, con la finalidad de proteger a las células neuronales. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva y descontrolada puede ser una fuente adicional de daño para la integridad y el funcionamiento de las células neuronales huésped, esto debido a que los tejidos neuronales poseen una regeneración celular limitada, además de que el SNC es en exceso vulnerable a procesos inmunes e inflamatorios descontrolados (Díaz *et al.*, 2012).

2.2. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas hacen referencia a los trastornos del SNC que causan alteraciones en las células neuronales y que afectan de manera progresiva a una zona o grupo de células nerviosas específicas (Calsolaro y Edison, 2016).

Según el grupo neuronal involucrado en las afecciones, será la sintomatología clínica que la persona desarrollará. En los procesos neurodegenerativos, la neuroinflamación actúa como un factor detonante de daño, que conduce al daño cognitivo progresivo. Entre las enfermedades con mayor prevalencia se encuentran el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple, por mencionar algunas (Awasthi *et al.*, 2016).

2.3. Células de la glía

2.3.1. Microglía

Las células microgliales, fueron descritas por primera vez en 1932 por Del Río Hortega y representan entre el 5-15% de la población celular total en el cerebro. Se distribuyen mayoritariamente en el hipocampo y en la llamada sustancia negra. Las células microgliales son consideradas como el macrófago del cerebro y son capaces de realizar fagocitosis y presentación de antígenos, lo cual las convierte en las células representativas del sistema inmune en el SNC (Morales *et al.*, 2010).

La microglía desempeña tareas cruciales en los procesos de neurogénesis, plasticidad neuronal y regeneración neuronal, pero también constituyen la primera línea de defensa inmunológica del SNC. Se caracterizan por tener la capacidad de fagocitar productos tóxicos, liberar factores citotóxicos y también en algunos casos pueden ser células presentadoras de antígeno (Trifilo y Lane, 2003). Estas células se encuentran inactivadas o en un estado de reposo cuando no hay presente un estímulo extraño, en este estado de reposo se les aprecia con una morfología claramente ramificada con la cual puede verificar las regiones cercanas a su ubicación sin necesidad de interferir con las neuronas ni con sus actividades. Sin embargo, cuando estas células son activadas, tienen marcados cambios morfológicos, convirtiéndose en una especie de ameboide móvil que tiene la capacidad de llegar hasta el sitio de la lesión para acabar con el patógeno (Díaz *et al.*, 2012).

Debido a su peculiar patrón de activación, las células microgliales pueden ser clasificadas en dos tipos de células con fenotipos diferentes: M1 (clásicamente activado), y M2 (alternativamente activado). El primer fenotipo, M1 es capaz de responder, en combinación con interferón- γ , al lipopolisacárido (LPS) provocando una respuesta inflamatoria masiva en la que se liberan moléculas proinflamatorias como las interleucinas 1β (IL-1 β), IL-12, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), asimismo también es capaz de liberar el óxido nítrico sintasa inducible. Por otro lado, se tiene el fenotipo M2a, que generalmente se activa con el estímulo de las interleucinas IL-4 e IL-13, las cuales tienen características anti-inflamatorias. Existe también el fenotipo M2b que tras la formación de complejos inmunes *Toll like* o IL-1 β , es estimulado para su activación. Por último, M2c, que están presentes en forma de macrófagos desactivados, encargados de la supresión de las citocinas proinflamatorias. Se sabe que los cambios de M2 a M1 y viceversa es un proceso dinámico, el cual tiene un papel significativo en la inflamación periférica (Calsolaro y Edison, 2016).

Los procesos neuroinflamatorios se activan como respuesta a la aparición de los agregados β -amiloide (A β). Si bien, la inflamación es un proceso neuroprotector al inicio, cuando no es posible resolver el estímulo activante de dicha inflamación, puede resultar en una respuesta inflamatoria crónica neurodegenerativa (Abott *et al.*, 2006).

2.3.2. Astrocitos

Los astrocitos residen en el SNC y actúan como puente para suministrar los nutrientes desde los capilares sanguíneos hacia las neuronas y son el lugar principal de reserva de glucógeno en el cerebro. Los astrocitos una vez activados sufren diversas modificaciones estructurales denominadas astrocitosis, cuya característica principal es un aumento en el número y tamaño de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), que forma parte del citoesqueleto de filamentos intermedios expresados principalmente por estas células y es considerada su principal marcador (McGraw *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que cuando estas células se activan, producen una variedad de moléculas que están presentes en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria. Esto incluye a varias citocinas pro y anti- inflamatorias, quimiocinas, eicosanoides, prostaglandinas y tromboxanos (Abott *et al.*, 2006). También, llevan a la expresión de la ciclooxigenasa tipo-2 (COX-2) y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNos) la cual sintetiza NO, una molécula importante para causar estrés oxidativo y muerte neuronal (Díaz *et al.*, 2010).

2.4. Moléculas neuroinflamatorias

Entre las moléculas neuroinflamatorias que promueven la neuroinflamación, encontramos a la proteína precursora amiloide (PPA), la cual al ser degradada de manera secuencial por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, generan principalmente péptidos amiloidogénicos insolubles de entre 40 y 42 aminoácidos (von Bernhardt, 2007).

Se ha observado que la citocina IL-1 β , el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y la ciclo-oxigenasa inducible (COX-2) se encuentran en concentraciones elevadas en pacientes que presentan algún tipo de demencia (von Bernhardt, 2007).

En su papel protector del SNC la glía expresa de manera constitutiva citocinas, las cuales tienen participación en algunos procesos complejos y son las encargadas de modular algunas funciones entre las que encontramos la homeostasis, el metabolismo celular, la función y plasticidad sináptica, la transmisión neural, entre otras. Al presentarse una infección o algunas condiciones de estímulo la glía se encarga de producir quimiocinas, citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ IL-10 y TGF β) y prostaglandinas (von Bernhardt, 2007).

Son estas moléculas las que se encargan de potenciar la neurodegeneración puesto que aumentan la sensibilidad neuronal a los radicales libres. Las moléculas neuroinflamatorias juegan un papel crucial para activar cascadas de señalización que inducen la inflamación, oxidación y finalmente, la neurodegeneración (Morales, *et al.*, 2010).

2.4.1. Mediadores neuroinflamatorios

Las citocinas son moléculas activas de gran tamaño (15-25 kDa), pertenecientes a una familia grande y heterogénea de proteínas que son producidas y liberadas principalmente a través de células inmunes como monocitos, macrófagos y linfocitos, además de microglía y astrocitos. Estos factores inmunes son producidos por diversos estímulos tanto en condiciones patológicas como fisiológicas; son activadas durante situaciones en las que se producen inflamación, infección y/o alteraciones inmunológicas y están implicadas principalmente en la reparación de tejidos dañados y la restauración de la homeostasis (Kiguchi *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2017). En condiciones fisiológicas sus niveles se mantienen bajos, sin embargo, cuando el microambiente del SNC se ve alterado por lesiones como traumatismos, infecciones o ataques isquémicos, el organismo produce una reacción neuroinflamatoria a través de la microglía, los astrocitos y neuronas, las cuales, al ser estimuladas, producen niveles altos de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas (Kim *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2017)

Las encargadas de mediar las señales entre células inmunes son las citocinas y de manera general, se dividen en citocinas proinflamatorias (que facilitan y promueven la respuesta inflamatoria) y antiinflamatorias (que inhiben dicho proceso), el equilibrio existente entre estos grupos es el encargado de mediar la inflamación, así como la intensidad y duración de la respuesta inmune (Domingues *et al.*, 2017).

La inflamación y las cascadas de citocinas proinflamatorias se han relacionado con una variedad de enfermedades que afectan al corazón, pulmón e hígado, así como al sistema nervioso central (Qin *et al.*, 2008). Entre las citocinas más relevantes para la respuesta inmune en el SNC se encuentran:

2.4.1.1. TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina pleiotrópica que exhibe efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios. Es miembro de una superfamilia grande y compleja de ligandos solubles y unidos a membrana que

típicamente se unen a más de un receptor (Becher *et al.*, 2016). TNF- α es sintetizado por macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y otras células, señala a través de dos receptores triméricos de membrana: los receptores 1 y 2 de TNF- α (TNFR1 y TNFR2). Estos receptores son expresados por la mayoría de las células del ser humano. Por una parte, TNFR1 es expresado en células nucleadas, mientras que TNFR2 tiene una mayor regulación y únicamente se expresa en células del sistema inmune, endoteliales y nerviosas (Fragoso *et al.*, 2014). Es una citocina proinflamatoria clave que, al interactuar con sus receptores afines en células diana, producen cadenas de señalización capaces de controlar procesos celulares relacionados con la viabilidad celular, la expresión génica, la homeostasis iónica y la integridad sináptica en la respuesta inmune del SNC, así como inducir la secreción de otras citocinas y enzimas en diversas células y tejidos (Qin *et al.*, 2008; Azizi y Mirshafiey, 2012).

TNF- α funge principalmente como mediador inflamatorio y es producido activamente por la microglía durante la inflamación, debido a que los niveles de esta molécula son bajos en cerebros sanos, se ha dificultado la determinación de su función biológica en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, se infiere que, en el cerebro, actúa como transmisor glial, que envuelve y rodea las sinapsis y regula la comunicación sináptica entre neuronas, entre otras funciones. Recientemente se ha demostrado que juega un papel clave en la muerte celular mediada por neuroinflamación en diferentes neuropatologías (Azizi y Mirshafiey, 2012; Domingues *et al.*, 2017).

2.4.1.2. IL-1 β

La interleucina 1 β (IL-1 β) es una citocina proinflamatoria clave asociada con la neurodegeneración. Pertenece a la familia IL-1, que cuentan con dos receptores de la superficie celular. El receptor tipo I (IL-1 R1) posee penetración citoplasmática capaz de transmitir la señal de manera intracelular. Por su parte, el receptor tipo II (IL-1 RII) carece de dominio citoplasmático, lo que lo vuelve incapaz de transmitir la

señal. El receptor tipo I es encontrado principalmente en células T, mientras que el receptor tipo II es expresado en neutrófilos, monocitos y células B, principalmente (Ruiz, 2002).

Se ha descrito que IL-1 β regula el procesamiento de PPA y la producción de A β ; afecta la síntesis y el procesamiento de PPA, lo cual aumenta la liberación de sPPA lo que lleva a un incremento potencial en la producción de A β , lo que puede contribuir a la formación y progresión de la placa, la proliferación de neuritas distróficas y la pérdida neuronal, lo que contribuye a la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Qin *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2017).

Actualmente, la elevación de IL-1 β es reconocida como un componente crítico de la respuesta patrón del cerebro a las agresiones, la neuroinflamación, y del reclutamiento de leucocitos al SNC. Esta respuesta se caracteriza por la activación astrocítica y microglial, como respuesta tanto al A β como al daño neuronal, y pueden convertirse en una fuente crónica de citocinas neurotóxicas y ROS. Además, IL-1 β es un potente estímulo para la expresión y actividad inducible de la enzima óxido nítrico sintasa en el cerebro y el derrame de metabolitos de NO en el líquido cefalorraquídeo (Qin *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2017).

2.4.1.3. IL-6

La interleucina 6 (IL-6) es un miembro de la familia de citocinas de tipo IL-6, que incluye al factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar y oncostatina M, secretada por linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, sinoviocitos y células tumorales. Estímulos diversos, como las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β desencadenan la producción de esta citocina. Su receptor unido a membrana consiste en una cadena de unión a IL-6 (IL-6Ra) que se en los hepatocitos, leucocitos, megacariocitos y por células del SNC. La IL-6R soluble está presente en la circulación periférica y en los sitios de inflamación. La IL-6 es una citocina pleiotrópica multifuncional involucrada en la regulación de las respuestas inmunes,

respuestas de fase aguda, hematopoyesis e inflamación. Debido a los múltiples procesos biológicos controlados por esta citocina, algunos autores le atribuyen un importante papel en fisiopatologías como EA y artritis reumatoide (Azizi y Mirshafiey, 2012; Akdis *et al.*, 2016; Feria-Díaz *et al.*, 2020).

2.4.1.4. IL-10

La IL-10 es una interleucina antiinflamatoria producida principalmente por monocitos, células T (principalmente células Treg tipo 1), células B (principalmente células Breg), una pequeña fracción de células NK, macrófagos y células dendríticas. El complejo receptor para IL-10 se compone de 2 cadenas: IL-10R1 e IL-10R2. IL-10 y afecta directamente las funciones de las células presentadoras de antígeno, al regular negativamente la expresión del MHC clase II y moléculas coestimuladoras en las superficies de macrófagos y monocitos. La IL-10 inhibe la expresión de muchas citocinas proinflamatorias, quimiocinas y receptores de quimiocinas, promueve la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las células B humanas y aumenta la producción de IgG4. Varios modelos murinos demuestran la importancia de IL-10 en la regulación de la respuesta inflamatoria (Akdis *et al.*, 2016).

2.5. Barrera hematoencefálica

El SNC requiere de un ambiente extracelular altamente regulado, en el cual las concentraciones de iones, neurotransmisores, proteínas antiinflamatorias y proinflamatorias entre otras, deben ser sumamente controlados para mantener la función neural apropiada (Gupta *et al.*, 2019).

A diferencia del resto del cuerpo, el SNC posee capilares que han adquirido la función de restringir el tránsito de moléculas y células entre el cerebro y la sangre. Dicha función dinámica y homeostática en la microcirculación cerebral es realizada por la barrera hematoencefálica (BHE) (Dhanda y Sandhir, 2018).

La BHE se constituye de la unidad neurovascular, la cual hace referencia a una estrecha asociación entre una monocapa de células endoteliales continua no fenestrada, que se unen entre ellas por medio de uniones estrechas complejas que conforman una barrera de alta resistencia para el paso de iones y pequeñas moléculas hidrofílicas; la matriz extracelular, pericitos, las neuronas cercanas y los astrocitos, que con su pie terminal ayudan a mantener la permeabilidad de la BHE ya que sella la pared celular que forman las células endoteliales y los pericitos para mantener la homeostasis. En conjunto, los componentes de esta unidad realizan funciones enzimáticas y de transportadores para mantener la permeabilidad selectiva característica de la BHE (Fig. 1) (Abbot *et al.*, 2006). Sin embargo, en condiciones patológicas se altera la permeabilidad selectiva que proporciona la BHE, comprometiendo seriamente las funciones del SNC (Barar *et al.*, 2016).

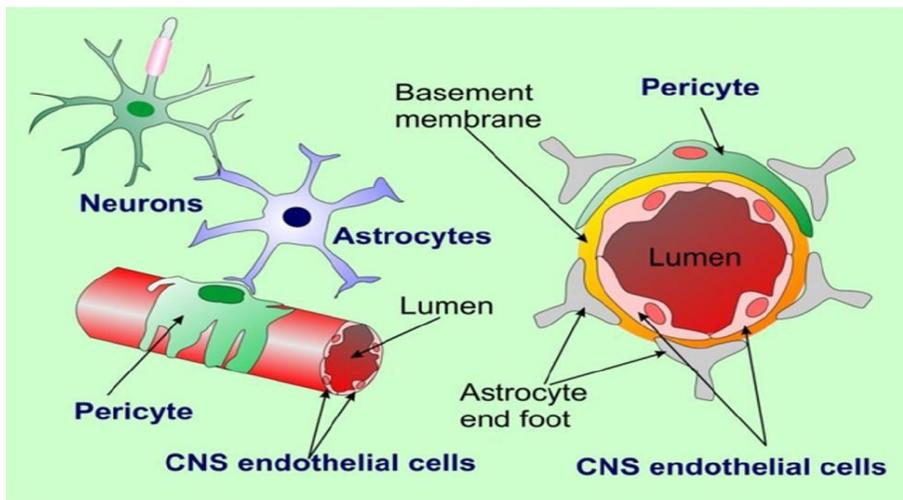


Fig 1. Principales constituyentes de la BHE localizada en los vasos capilares dentro del SNC para evitar que moléculas de gran tamaño puedan acceder y afectarlo (Gupta, 2019).

2.6. Tratamientos farmacológicos

Entre los distintos tipos de medicamentos utilizados para combatir las enfermedades neurodegenerativas encontramos los siguientes:

La primera línea de fármacos aprobada por la FDA, son medicamentos como rivastigmina, donepezil y galantamina, que tienen como blanco los inhibidores de colinesterasas (ChEI) los cuales son utilizados en pacientes con disfunción cognitiva como la producida por la EA y demencias neurodegenerativas.

En la tabla 1 se presentan los tratamientos utilizados en la actualidad para las diversas demencias neurodegenerativas (Robles, 2019):

Tabla 1. Fármacos que se prescriben habitualmente para tratar demencias y manifestaciones de la neurología cognitiva	
Motivo de prescripción	Fármacos con indicación o con eficacia reconocida
Enfermedad de Alzheimer	Inhibidores de colinesterasas, memantina
Síndrome o fenocopia de Huntington	Tetrabenazina, deutetrabenazina, neurolépticos
Síntomas psicóticos primarios en demencia degenerativa	Antipsicóticos de 2° generación, rivastigmina, donepezilo
Parkinsonismo en pacientes con trastorno cognitivo-afectivo de origen degenerativo	Levodopa, agonistas dopaminérgicos no ergóticos, inhibidores de la monoaminoxidasa-B (IMAO-B)
Ataxia en neurodegeneración con demencia	Miglustat, riluzol

Sin embargo, se ha reportado que un número significativo de personas han experimentado efectos secundarios como náuseas, vómitos, diarrea, anorexia, dolor de cabeza, síncope, dolor abdominal y mareos (Ray y Lahiri, 2009).

Los tratamientos ya mencionados, son útiles, pero no tienen la capacidad de detener el progreso de las enfermedades neurodegenerativas o incluso, de combatir las.

Actualmente, investigadores se encuentran realizando ensayos con distintos tipos de fármacos con una variada acción y blanco celular para lograr un tratamiento más eficaz, pero debido al traslape sintomatológico de las enfermedades neurodegenerativas, la búsqueda de fármacos y vías de diagnóstico más eficaces se torna complicada (Robles, 2019). Ante el gran problema de salud pública que representan las enfermedades neurodegenerativas y los resultados poco favorables de las sustancias prescritas, existe una línea de investigación enfocada en buscar en las plantas medicinales como una mejor alternativa de tratamiento. *Tagetes lucida* es una planta que tiene compuestos con actividades biológicas importantes que podrían ser de utilidad en el tratamiento de la neuroinflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas (Ray y Lahiri, 2009).

2.7. *Tagetes lucida*

Tagetes lucida o “Pericón”, es una planta herbácea perenne, erecta, hasta de 80 cm de alto, con olor a anís al estrujarse, tallos generalmente varios o muchos partiendo de la base, más o menos ramificados, glabros; hijas indivisas, sésiles, lineares a oblongas, elípticas y lanceoladas, de 2 a 10 cm de largo, de 0.5 a 2 cm de ancho, agudas a redondeadas en el ápice, márgenes aserrados; cabezuelas dispuestas en corimbos, sobre pedúnculos bracteados hasta de 1 cm de largo; involucre cilíndrico, de 4 a 12 mm de alto, sus brácteas 5 a 7, con los ápices subulados; flores liguladas 3 ó 4, amarillas, sus láminas flabeladas o suborbiculares, de 3 a 6 mm de largo; flores del disco 5 a 8, sus corolas amarillas, de 4 a 6 mm de largo; aquenios linear-claviformes, de 5 a 8 mm de largo, negruzcos, glabros o algo hispídulos, vilano de 2 escamas aristiformes, de 3 a 5 mm de largo y 4 ó 5 escamas romas de 1 a 2 mm de largo (Fig. 2 y 3). Ampliamente distribuida en el valle, en zonas cerriles y montañosas, menos frecuente en la parte norte. Se puede encontrar entre los 2250-2900 msnm en pastizales, bosques de *Quercus* y de coníferas, preferentemente en condiciones de disturbio (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2005).

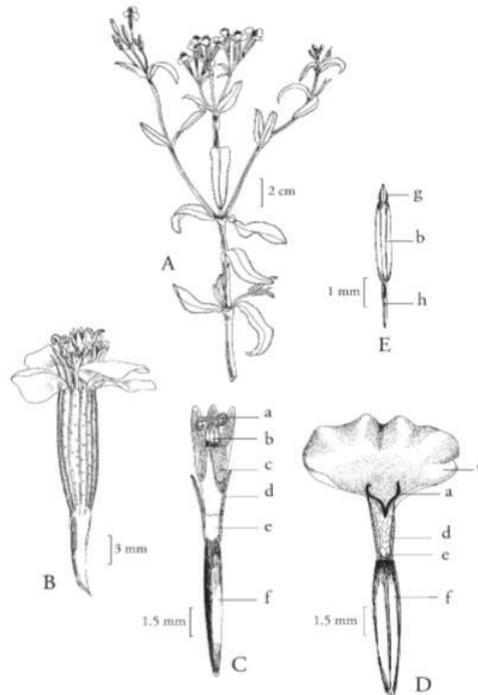


Figura 2. *Tagetes lucida*: **A.** rama con inflorescencias; **B.** capítulo; **C.** flor del disco, **a.** estigma, **b.** antera, **c.** corola, **d.** arista del vilano, **e.** escama del vilano, **f.** aquenio; **D.** flor ligulada; **E.** estambre, **g.** apéndice de la antera, **h.** filamento (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2005).

2.7.1. Clasificación taxonómica



Fig 3. *Tagetes lucida*

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Asteridae Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Tagetes*

Especie: *T. lucida*

(CONABIO, 2009)

2.7.2. Distribución geográfica

Tagetes lucida es una planta endémica de Guatemala y México. En México es posible encontrarla en los siguientes Estados: Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas (Fig. 4) (CONABIO, 2009).



Figura 4. Ubicación geográfica de *Tagetes lucida* dentro del territorio mexicano, esta especie tiene una amplia distribución en México, sin embargo, está ausente en 5 estados, los cuales son Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (CONABIO, 2009).

2.7.3. Usos de *Tagetes lucida* en la medicina tradicional

En México *Tagetes lucida* es ampliamente utilizada por curanderos para tratar padecimientos culturales como “susto” o “nervios”, el estrés, shock y también es utilizada en algunas regiones del territorio mexicano como planta ritual (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

En diferentes regiones de México, hasta el momento, en la literatura se menciona que el extracto hidroalcohólico e infusiones de las partes aéreas de *Tagetes lucida* son ampliamente utilizados para el tratamiento de ansiedad y depresión en algunas regiones de México donde la medicina tradicional es más utilizada (Guadarrama, 2012).

En la medicina tradicional mesoamericana, se le conoce como planta “caliente”, útil para tratar enfermedades consideradas frías (según el sistema frío-caliente). Existen reportes en los que se menciona su uso como insecticida y para tratar la inflamación (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

2.7.4. Estudios farmacológicos

Debido al uso medicinal tradicional que las partes aéreas o flores de esta planta han tenido, se han evaluado mediante estudios farmacológicos sus propiedades. Estos estudios han reportado un efecto antibacteriano, insecticida, citotóxico, antioxidante y con efectos parecidos a los antidepresivos (Aquino, 2002). Se ha demostrado que la preparación acuosa y alcohólica de esta especie posee un efecto ansiolítico y sedante mediante la participación de la neurotransmisión serotoninérgica y GABAérgica. Dentro de los estudios se encontró que las principales sustancias de los extractos podrían ser las cumarinas (Pérez *et al.*, 2016).

Las diferentes propiedades farmacológicas del aceite esencial de *T. lucida* son bien conocidas en la etnomedicina y algunos han sido confirmados experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo* en distintos estudios realizados. Se ha mostrado así, su efecto antimicrobiano, antioxidante, analgésico, sedante y antiinflamatorio. Sin embargo, no se ha evaluado la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de esta planta (Serrato, 2010; Sepúlveda *et al.*, 2012).

2.8. Modelo experimental de inflamación con TPA

El modelo de inflamación con TPA es utilizado de manera experimental para producir una inflamación local. El TPA es un éster de forbol que puede permear las membranas celulares y causar irritación. Se diluye en 1 µl de acetona y

posteriormente se administra con una micropipeta a la oreja del ratón, lo cual induce una vasodilatación de la piel y el eritema ocurre en un tiempo que va de 1-2 h hasta 3-4 h. Histológicamente, se puede observar que la oreja comienza a engrosarse debido a una fuga de líquido y el edema alcanza su máximo a las 6 h, disminuyendo después de 24 h aproximadamente (Gábor, 2000).

2.8.1. Mecanismo de acción de TPA

El mecanismo por el cual el TPA causa la inflamación no es completamente claro, pero parece estar relacionado con la liberación de eicosanoides. Los inhibidores de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos han demostrado ser activos en este modelo, razón por la cual, se ha utilizado ampliamente para llevar a cabo pruebas experimentales para fármacos antiinflamatorios. Los mediadores implicados en esta inflamación aguda no se han dilucidado por completo. Sin embargo, está bien establecido que el TPA estimula la fosfolipasa A2 que da como resultado la liberación de ácido araquidónico (AA) y prostaglandinas (PG). La epidermis de ratón tratada con éster de forbol *in vivo* representa un modelo útil para el estudio de tales respuestas inflamatorias e hiperproliferativas de la piel *in statu nascendi* más que en un estado crónico (Gábor, 2000).

2.9. Modelo de neuroinflamación inducida con LPS

El LPS se ha utilizado en modelos experimentales de neuroinflamación y amiloidosis, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el caso de la inflamación sistémica inducida por LPS se utiliza en varias enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis amiotrófica y esclerosis múltiple.

El LPS es un componente presente en la membrana externa de bacterias *gram* negativas. Se trata de una endotoxina muy potente y altamente resistente a la degradación por enzimas de mamíferos, razón por la cual proporciona un estímulo inflamatorio persistente, que estimula la producción y liberación de citocinas proinflamatorias. Son estas citocinas las encargadas de activar los sistemas

neuroinmune y neuroendocrino que producen respuestas muy parecidas a las que se llegan a producir como consecuencia de un estrés conductual (Zakaria *et al.*, 2017).

Como consecuencia de la administración de LPS se produce una amplia gama de efectos conductuales no específicos que son conocidos de manera colectiva como “comportamientos de enfermedad” Dentro de estos comportamientos y sus respectivas alteraciones encontramos una reducción de la actividad motora, reducción en la exploración, disminución de interacción social, fiebre, reducción en consumo de alimentos y bebidas, hipersomnias, activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y una mayor activación simpática (Gábor, 2000).

2.9.1. Mecanismo de acción de LPS

El LPS se une a CD14 en las membranas de la microglía, las cuales forman el complejo LPS-CD14 que interactúa posteriormente con el receptor tipo *Toll-4* (TLR-4) quien a su vez, activa la microglía iniciando cascadas de transducción de señales que conducen a una transcripción y liberación de citocinas proinflamatorias como las interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL17A, IL-18, p40, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α); quimiocinas como CCL2, CCL5 y CXCL8; proteínas del sistema del complemento como los receptores C3, C3a y C5a y citocinas antiinflamatorias como IL-10 y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Se ha demostrado que el nivel de expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el hipocampo aumentó en comparación con los controles después de tres días de administración de LPS. La bibliografía señala también que la inflamación inducida con LPS promueve la patología de EA debido a que altera el transporte de A β en la barrera hematoencefálica (BHE) y disminuye la depuración central de A β . Debido a la alteración de la BHE se aumenta de manera eficaz la afluencia cerebral de A β , pero disminuye su flujo. Se ha mostrado que el nivel de expresión de A β en el hipocampo aumenta en comparación con los controles después de 7 días de administración de LPS. (Zakaria *et al.*, 2017).

Se ha mostrado que la administración crónica de LPS provoca la muerte de células neuronales y se cree que esto podría ser el resultado de la activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK). Bajo condiciones fisiológicas normales, la COX-2 es apenas detectable, sin embargo, puede ser inducida rápida y transitoriamente por mediadores proinflamatorios y estímulos mitogénicos, regulando de esta manera los efectos nocivos en los trastornos neurodegenerativos (Zakaria *et al.*, 2017).

La presencia de LPS puede interrumpir la consolidación de ciertos procesos de memoria. La administración aguda de LPS antes del entrenamiento deteriora el condicionamiento del miedo contextual en un paradigma de aprendizaje dependiente del hipocampo; también se ha observado que la administración crónica de LPS afecta la memoria espacial e induce déficits de memoria y aprendizaje análogos al deterioro cognitivo de EA. Por otra parte, la administración sistémica de LPS produce una alteración selectiva del hipocampo en la discriminación contexto-objeto, pero no a la memoria espacial (Zakaria *et al.*, 2017).

En un estudio de Zhu *et al.* (2014), los resultados demostraron que 7 días de administración de LPS aumentaron de manera significativa la latencia de la plataforma y disminuyeron la proporción de tiempo pasado en el cuadrante objetivo durante la prueba del laberinto acuático de Morris en comparación con 3 días de administración de LPS. También se observó una expresión incrementada de A β en el hipocampo después de la administración de LPS durante 7 días, pero no durante 3 días, lo cual indica que la expresión incrementada de A β puede ser un factor principal en la patogénesis de la disfunción cognitiva (Zakaria *et al.*, 2017).

2.10. Modelos conductuales

El miedo es definido como una respuesta dada por un organismo ante una amenaza conocida, externa o que pueda poner en riesgo su homeostasis, dicha respuesta garantiza que los individuos dotados con la capacidad para enfrentarse a una

situación amenazadora o potencialmente dañina. Las respuestas de los organismos pueden ser fisiológicas y comportamentales

En los seres humanos, cuando la respuesta es excesiva, los síntomas son intensos y generan un grado de incapacidad en los ámbitos familiar, social y laboral, esta respuesta se considera patológica y se denomina trastorno de ansiedad.

Las investigaciones con modelos animales permiten imitar los procesos psicológicos normales y anormales como síntomas o síndromes psicopatológicos humanos y tratamientos para las enfermedades evaluadas. Algunos modelos de ansiedad incluyen procedimientos con humanos, sin embargo, son menos utilizados por motivos éticos y económicos. Es por esta razón que los modelos animales han sido bastante manejados para investigar patologías, especialmente ansiedad.

La ansiedad ha sido estudiada extensamente en modelos animales y existen más de treinta utilizados. Algunos recurren a respuestas condicionadas y otros modelos utilizan respuestas más naturales de la especie por lo cual son considerados modelos etológicos o de respuestas no condicionadas.

2.10.1. Prueba de campo abierto

Entre los modelos de respuesta incondicionada de mayor utilización se encuentra la prueba de campo abierto (CA), desarrollada por Calvin Hall en 1934. La prueba busca evaluar la actividad locomotora espontánea de los ratones (Martínez *et al.*, 2015).

La prueba consiste en la medición de conductas producidas al colocar a un sujeto en un espacio abierto nuevo, donde no pueda escapar debido al muro que lo rodea. El individuo puede ser colocado al centro o cerca de las paredes del dispositivo y se observa durante 2 a 20 minutos (Mora-Gallegos y Salas, 2014).

Se han incluido numerosas medidas en los estudios desde su creación, actualmente existen más de treinta, entre ellas se encuentran las ubicaciones de las zonas del campo, movimientos corporales como olfateo, excavación, acicalamientos,

exploración visual, entre otros. También se pueden incluir medidas del sistema nervioso autónomo, tales como defecación, micción y frecuencia cardíaca, por mencionar algunos (Polanco *et al.*, 2011).

3. Justificación

El sistema neuroinmune, está coordinado por las células de la microglía, vulnerables a la inflamación. En la neuroinflamación, se observan alteraciones en la concentración de citocinas, que propician un desequilibrio fisiológico que puede manifestarse a través de cambios conductuales, incluyendo afectaciones motoras.

La neuroinflamación contribuye a una gran variedad de enfermedades neurológicas en las que los mediadores como el TNF- α , IL-1 β , IL-6 aumentan su concentración, propiciando un ambiente celular pro-inflamatorio. Por otro lado, la inflamación sistémica ocasiona un incremento en la generación de citocinas circulantes, que generan un impacto negativo sobre el SNC y se ha reportado que la administración intraperitoneal de LPS, induce neuroinflamación y daño motor, característico de enfermedades neurodegenerativas.

El tratamiento actual para algunas enfermedades neurodegenerativas consiste en retardar la progresión del proceso patológico y algunos síntomas conductuales asociados. Sin embargo, no detienen el progreso de la enfermedad y causan efectos secundarios adversos como hepatotoxicidad, ansiedad, depresión e insomnio, los cuales afectan la calidad de vida de los individuos. Actualmente, continúa la investigación de nuevas y mejores alternativas que permitan, por un lado, un mayor conocimiento del mecanismo patológico y por el otro, un mejor tratamiento para los pacientes.

En este proyecto se propuso el estudio de *Tagetes lucida* en la búsqueda de compuestos con propiedad sobre el proceso de inflamación, usando dos modelos uno con la aplicación local de TPA en oreja de ratón, inflamación aguda, lo que permitió dar un seguimiento químico-farmacológico. Mientras que el otro, sistémico y subcrónico, el de neuroinflamación con LPS, que llevó a la evaluación de aquellos compuestos con mayor actividad antiinflamatoria. Además, de que en dicho protocolo se pudo medir la concentración de citocinas, tanto en bazo como en cerebro de los animales, así como su comportamiento motor en campo abierto.

4. Hipótesis

Los extractos y compuestos aislados de *Tagetes lucida* promueven la actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema auricular inducido con TPA e inducen un efecto antineuroinflamatorio al reducir la concentración de citocinas proinflamatorias y aumentar la concentración de la citocina IL-10, así como al actuar sobre la actividad motora en ratones con neuroinflamación inducida con LPS.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antineuroinflamatorio de *Tagetes lucida* en un modelo de daño inducido con LPS.

5.2. Objetivos particulares

1. Medir el efecto anti-inflamatorio de extractos y los compuestos aislados de *Tagetes lucida* en el ensayo de edema auricular en ratón inducido con un éster de forbol (TPA).
2. Evaluar el efecto antineuroinflamatorio del extracto y los compuestos activos aislados de *Tagetes lucida*, a través de la cuantificación de la concentración cerebral de IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10, en ratones con LPS, mediante el ensayo de ELISA.
3. Evaluar el efecto anti-inflamatorio a nivel sistémico, del extracto y los compuestos activos aislados de *Tagetes lucida*, a través de la medición de la concentración esplénica de IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10, en ratones con LPS, mediante el ensayo de ELISA.
4. Determinar el efecto de la administración oral del extracto y los compuestos activos aislados de *Tagetes lucida* sobre la conducta motora de ratones con neuroinflamación-inducida con LPS, mediante la prueba de campo abierto.
5. Realizar la elucidación estructural de los compuestos aislados de *Tagetes lucida*, usando técnicas espectrométricas.

6. Materiales y métodos

El desarrollo experimental del presente proyecto fue realizado en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS). A continuación, se detalla en los siguientes esquemas, los procedimientos necesarios para la realización del proyecto.

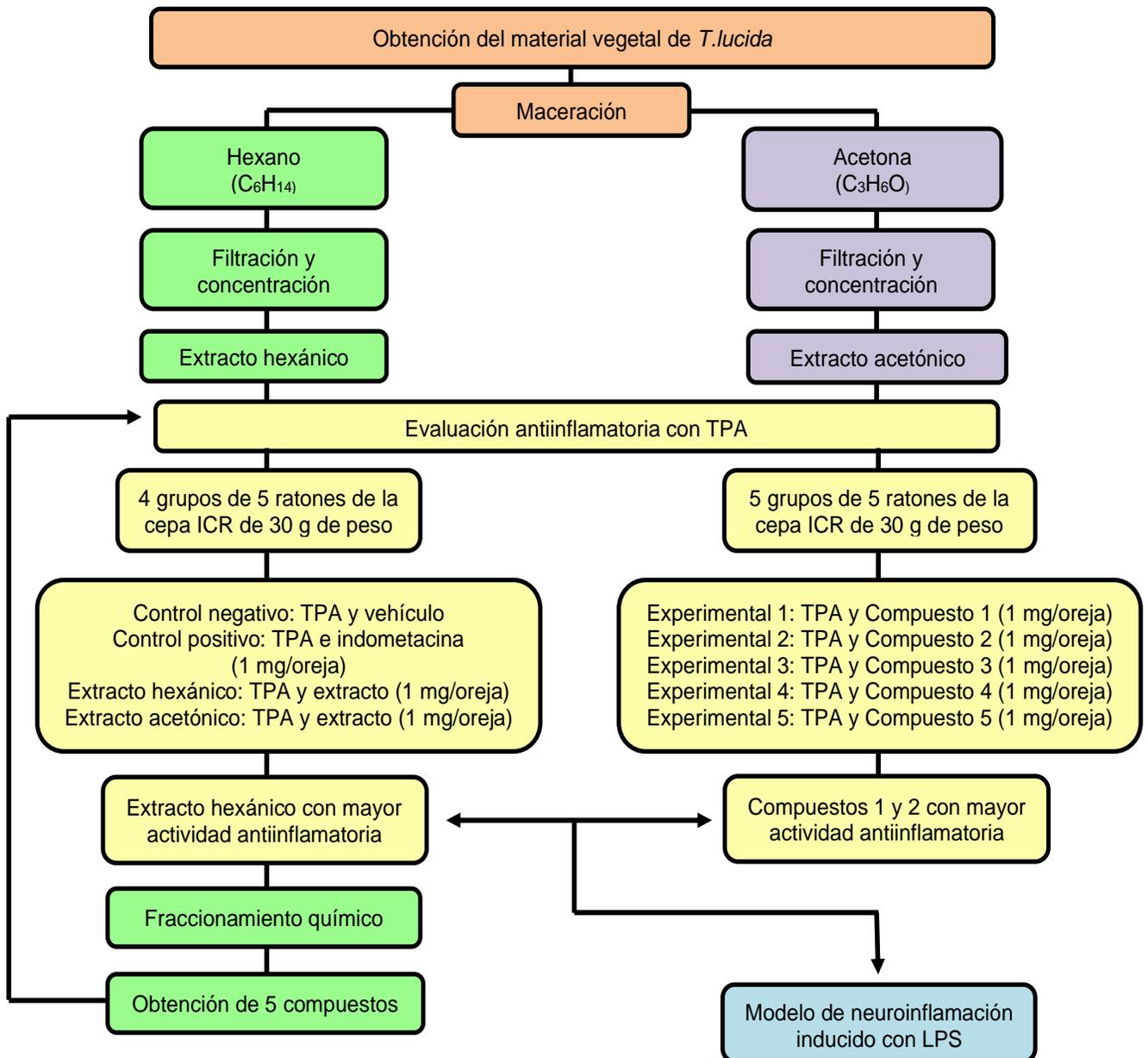


Fig 5. Diagrama de flujo del trabajo fitoquímico-farmacológico. Se realizaron pruebas de screening de los extractos hexánico y acetónico en la búsqueda del mejor tratamiento antiinflamatorio.

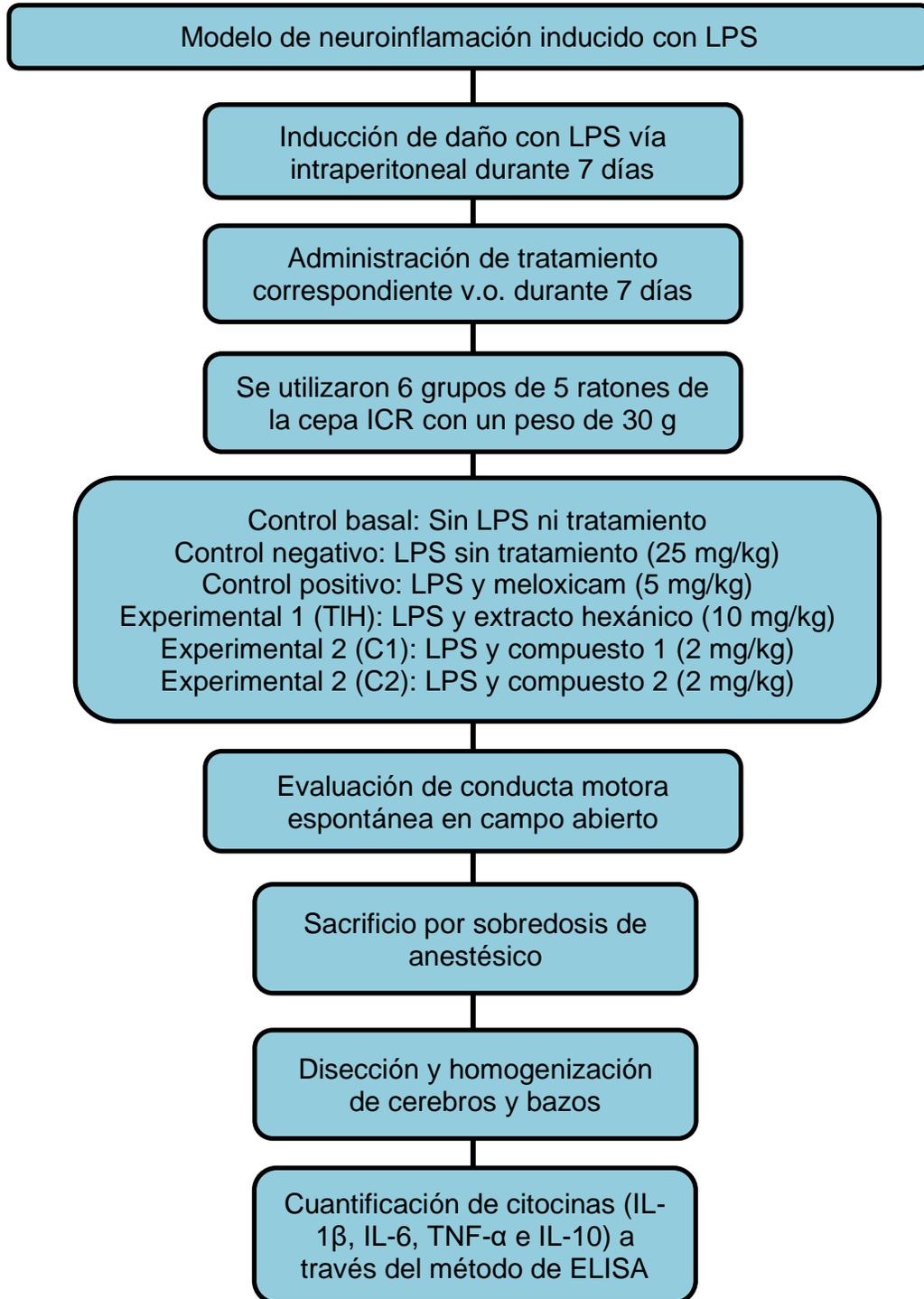


Fig 6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental utilizada en la fase de evaluación de la actividad antineuroinflamatoria *in vivo* en un modelo murino de neuroinflamación inducida con LPS.

6.1. Material vegetal y obtención del extracto

Se realizó una colecta de la especie *Tagetes lucida* durante su periodo de floración en el mes de septiembre del 2017, la colecta fue realizada en el municipio de Xochitepec, Morelos. Se envió un ejemplar colectado al INAH en el Jardín Etnobotánico para su identificación, la cual fue realizada por las M. en C. Margarita Avilés y Macrina Fuentes, el ejemplar enviado fue identificado como perteneciente a la familia Asteraceae y su especie *Tagetes lucida* con número de registro 2081. El material vegetal fue transportado al Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIS-IMSS).

El material fue pesado y secado en una liofilizadora (Marca Heto Drywinner, modelo DW3, EUA). Una vez seco, el material vegetal fue molido (Molino marca Pulve plastic, EUA) y macerado con hexano durante 24 horas, se retiró el disolvente a través de un proceso de filtración. El extracto obtenido fue concentrado a presión reducida en un Rotavapor (Marca Heildolph Laborota, modelo 4000, Alemania), el disolvente recuperado del procedimiento se utilizó para dos posteriores maceraciones repitiendo el procedimiento. Una vez que se obtuvo la totalidad del extracto hexánico (TIH), el material vegetal residual fue puesto en maceración con acetona, siguiendo el mismo procedimiento previo, para obtener, el extracto acetónico (TIAc).

6.2. Aislamiento y purificación de compuestos

De manera general el extracto TIH, con la mayor actividad anti- inflamatoria en el ensayo de TPA, fue procesado mediante columnas cromatográficas, como se muestra en el diagrama siguiente (el desarrollo de esta parte del proyecto se llevó a cabo con la dirección del Dr. Manasés González- Cortazar).

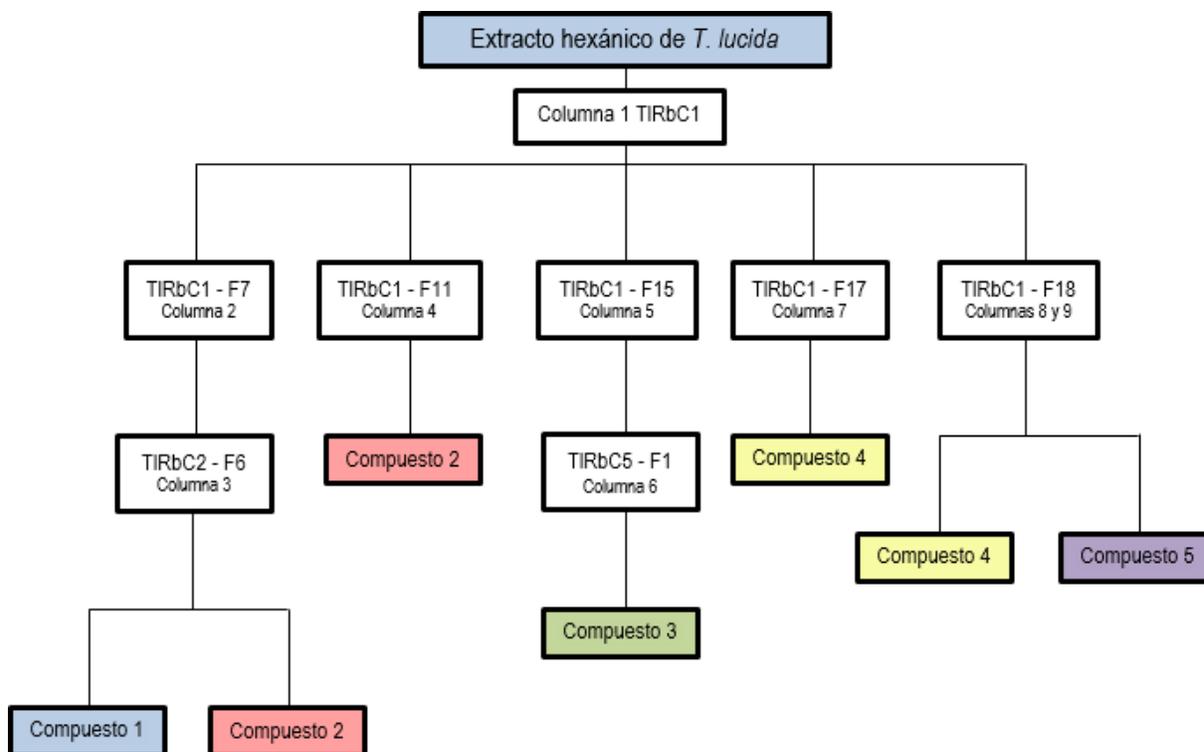


Fig 7. Resumen de columnas y compuestos extraídos durante el fraccionamiento químico del extracto hexánico de *T. lucida*.

Aplicando las técnicas cromatográficas convencionales, el extracto TIH fue sometido a separación sucesiva, como se observa en la fig. 7, usando una primera columna cromatográfica, llamada columna 1. Se utilizó el método de percolación con sílica gel de fase normal (Merck), para extraer 53 fracciones (en volúmenes de 200 mL) del extracto. Se fue haciendo un seguimiento por cromatografía en capa fina (CCF) de sílica gel de fase normal (Merck), que permitió el análisis del tipo de compuestos contenidos en las fracciones obtenidas, usando reveladores específicos para: flavonoides (difenilborinato), terpenos (hidroxibenzaldehído) y de manera general verificar la presencia de otras sustancias con el llamado “revelador universal”, sulfato cérico (ya que identifica toda la gama de compuestos). Se utilizó una mezcla de los solventes *n*-hexano (CH₆H₁₄) /acetato de etilo (CH₃COOCH₂CH₃) variando la proporción entre ellos, lo que permitió aumentar gradualmente la

polaridad del sistema, y de esta manera separar los diferentes compuestos contenidos en TIH.

De acuerdo con su parecido químico, las 53 fracciones fueron agrupadas en 20 reuniones (Tabla 2).

Una vez analizadas las fracciones de la columna 1, se tomó la fracción 7 (TIRbC1 - F7) que fue preparada para su separación, usando una segunda columna. Para ésta, se utilizaron 0.5 g de dicha fracción que fueron adsorbidos en 5 g de sílica de fase normal y empacados en una columna de vidrio (30 x 1.5 cm). El sistema de elución empleado fue *n*-hexano (CH₆H₁₄) /Acetato de Etilo (CH₃COOCH₂CH₃), del cual también se fue variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema, con la intención de limpiar el compuesto que previamente había sido observado en CCF como el mayoritario durante el procedimiento de separación con la columna 1. Así, de la columna 2 se realizaron 50 colectas de 200 ml que fueron posteriormente concentradas y almacenadas en viales. Cada muestra fue analizada mediante CCF, para poder hacer las reuniones correspondientes de acuerdo con la similitud química, de esta manera se obtuvieron 13 reuniones que se detallan en la tabla 3.

Posteriormente, se tomó la fracción 6 de la columna 2 (TIRbC2 - F6) con el propósito de aislar el primer compuesto. Para la tercera columna, se utilizaron 120 mg de dicha fracción que fueron adsorbidos en 0.5 g de sílica de fase reversa, que fueron empacados en una columna de vidrio (20 x 1 cm) con 10 g de sílica de fase reversa y se utilizó un sistema de elución de acetonitrilo (CH₃CN)/Agua (H₂O), variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema con la intención de aislar el compuesto previamente observado y al cual se denominaría compuesto 1 (C1, antes de su identificación estructural). Dicho procedimiento, dio lugar a 18 colectas de 15 ml, que fueron concentrados y devueltos a los mismos viales. El contenido, fue analizado mediante CCF, obteniendo de esta manera 5 reuniones que se detallan en la tabla 4.

Para la columna 4, se tomó la fracción 11 de la columna 1 (TIRbC1 - F11), con el fin de aislar un segundo compuesto, que se nombró inicialmente como C2 antes de su identificación estructural. Se utilizó 1 g de fracción, adsorbida en 1 g de sílica (0.5 g de fase reversa y 0.5 g de fase normal), empacados en una columna de vidrio (20 x 1 cm) con 10 g de sílica de fase reversa y se utilizó un sistema de elución de acetonitrilo (CH₃CN) /agua (H₂O) variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema con la intención de aislar C2. De manera que se realizaron 12 colectas de 15 ml, los cuales fueron concentrados y colocados en viales. El contenido, fue analizado mediante CCF, y como resultado se obtuvieron 5 reuniones detalladas en la tabla 5.

Para una quinta columna, fueron utilizados 1 g de la fracción 15 proveniente de la columna 1 (TIRbC1 - F15), en la cual se detectó por CCF un compuesto mayoritario. La fracción fue adsorbida en 1 g de sílica (0.5 g de fase reversa y 0.5 g de fase normal), empacados en una columna de vidrio (20 x 1 cm) con 10 g de sílica de fase reversa, con un sistema de elución de acetonitrilo (CH₃CN) /agua (H₂O), variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema con el fin de limpiar el compuesto 3 (C3, llamado así antes de la elucidación de su estructura). De esta manera se comenzó con la obtención de fracciones a partir una proporción 8:2 del sistema de solventes. Se recuperaron 17 muestras de 15 ml, que fueron concentrados y colocados en viales. El análisis por CCF llevó a la obtención de 3 reuniones que se detallan en la tabla 6.

Del procedimiento anterior (columna 5), se usó 1 g de la fracción 1 (TIRbC5 F-1), que fue adsorbido en 1 g de sílica (0.5 g de fase reversa y 0.5 g de fase normal), empacados en una columna de vidrio (20 x 1 cm) con 10 g de sílica de fase reversa, montando así la columna 6, que fue eluída con un sistema de acetonitrilo (CH₃CN) /agua (H₂O), variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema con el fin de limpiar, ahora, el llamado compuesto 3 (C3, hasta antes de su elucidación estructural). Se extrajeron 17 fracciones de 15 ml, que

fueron concentrados y almacenados en viales, para su análisis por CCF, generando 8 reuniones (Tabla 7).

La fracción 17 de la Columna 1 (TIRbC1 - F17), fue usada para montar la columna número 7, para llevar a cabo el aislamiento del cuarto compuesto (C4). Para este fin, 224.4 mg de dicha fracción se adsorbieron en 2 g de sílica (1 g de fase reversa y 1 g de fase normal) empacados en una columna de vidrio (20 x 1 cm) con 10 g de sílica de fase reversa. El sistema de elución utilizado fue de acetonitrilo (CH₃CN) /agua (H₂O) sin variación en la proporción de solventes. De esta columna se realizaron 23 colectas de 15 ml, los cuales fueron concentrados y almacenados en viales, para analizar cada contenido mediante CCF y como resultado del análisis cromatográfico se obtuvieron 8 reuniones detalladas en la tabla 8.

Finalmente, se montaron dos columnas más, 8 y 9. Para la primera se utilizaron 0.7109 mg de la fracción 18 de la columna 1 (TIRbC1 - F18), mientras que para la segunda fueron 474.7 mg de la misma fracción. Ambas columnas fueron realizadas para llevar a cabo el aislamiento del quinto compuesto (C5). Para la realización de ambas columnas se utilizaron respectivamente, 2 g de sílica (1 g de fase reversa y 1 g de fase normal) los cuales fueron empacados en una columna de vidrio (20 x 1 cm) con 10 g de sílica de fase reversa. El sistema de elución utilizado fue de acetonitrilo (CH₃CN) /agua (H₂O) sin variación en la proporción de solventes. En la columna 8 se realizaron 24 colectas de 15 ml, mientras que en la 9 se colectaron fueron 23 de 15 ml, todas fueron almacenadas y analizadas por CCF, los datos se muestran en la tabla 9.

En las siguientes tablas (2 al 9) se detallan los resultados de las columnas cromatográficas que fueron necesarias para la separación de los compuestos aislados, en cada uno de ellos se menciona el sistema de elución que se usó para el fraccionamiento, el número de fracciones colectadas, las reuniones que se hicieron con base en el perfil cromatográfico y por último las claves usadas para nombrarlas.

Tabla 2. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 1.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₆ H ₁₄ 100%	1 - 13	1 - 2	TIRbC1 – F1
		3	TIRbC1 – F2
		4 - 5	TIRbC1 – F3
		6 - 9	TIRbC1 – F4
		10 - 13	TIRbC1 – F5
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 90:10	14 - 22	14 - 15	TIRbC1 – F6
		16 - 18	TIRbC1 – F7
		19 - 20	TIRbC1 – F8
		21 - 22	TIRbC1 – F9
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 80:20	23 - 29	23 - 25	TIRbC1 – F10
		26 - 29	TIRbC1 – F11
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 70:30	30 - 36	30 - 34	TIRbC1 – F12
		35 - 36	TIRbC1 – F13
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 60:40	37 - 42	37 - 38	TIRbC1 – F14
		39 - 42	TIRbC1 – F15
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 50:50	43 - 49	43 - 45	TIRbC1 – F16
		46	TIRbC1 – F17
		47 - 49	TIRbC1 – F18
CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 100%	50 - 53	50 - 53	TIRbC1 – F19
CH ₃ OH 100%	54 - 56	54 - 56	TIRbC1 – F20

Tabla 3. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 2.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₆ H ₁₄ 100%	1 - 9	1 - 15	TIRbC2 - F1
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 90:10	10 - 22	16	TIRbC2 - F2
		17 - 22	TIRbC2 - F3
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 80:20	23 - 28	23 - 24	TIRbC2 - F4
		25	TIRbC2 - F5
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 70:30	29 - 36	26 - 34	TIRbC2 - F6
		35 - 36	TIRbC2 - F7
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 60:40	37 - 44	37 - 39	TIRbC2 - F8
		40	TIRbC2 - F9
		41 - 43	TIRbC2 - F10
		44	TIRbC2 - F11
CH ₆ H ₁₄ - CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ 50:50	45 - 49	45 - 49	TIRbC2 - F12
CH ₃ OH 100%	50	50	TIRbC2 - F13

Tabla 4. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 3.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₃ CN - H ₂ O 90:10	1 - 11	1	TIRbC3 - F1
		2	TIRbC3 - F2
		3 - 4	TIRbC3 - F3
		5 - 14	TIRbC3 - F4
CH ₃ OH 100%	12 - 18	15 - 18	TIRbC3 - F5

Tabla 5. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 4.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₃ CN - H ₂ O 90:10	1 - 11	1	TIRbC4 - F1
		2	TIRbC4 - F2
		3 - 4	TIRbC4 - F3
		5 - 14	TIRbC4 - F4
CH ₃ OH 100%	12 - 18	15 - 18	TIRbC4 - F5

Tabla 6. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 5.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₃ CN - H ₂ O 80:10	1 - 7	1 - 3	TIRbC5 - F1
CH ₃ CN - H ₂ O 90:10	8 - 12	4 - 12	TIRbC5 - F2
CH ₃ OH 100%	13 - 17	13 - 17	TIRbC5 - F3

Tabla 7. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 6.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₃ CN - H ₂ O 50:50	1 - 17	1	TIRbC6 - F1
		2	TIRbC6 - F2
		3	TIRbC6 - F3
		4 - 5	TIRbC6 - F4
		6 - 7	TIRbC6 - F5
		8 - 10	TIRbC6 - F6
		11 - 12	TIRbC6 - F7
		13 - 17	TIRbC6 - F8

Tabla 8. Resultados agrupados de las fracciones obtenidas en la columna 7.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reunión de fracciones	Claves usadas para las reuniones
CH ₃ CN - H ₂ O 50:50	1 - 23	1 - 3	TIRbC7 - F1
		4 - 7	TIRbC7 - F2
		8	TIRbC7 - F3
		9	TIRbC7 - F4
		10 - 11	TIRbC7 - F5
		12 - 13	TIRbC7 - F6
		14 - 17	TIRbC7 - F7
		18 - 23	TIRbC7 - F8

Tabla 9. Resultados agrupados de fracciones obtenidas en las columnas 8 y 9.

Sistema de elución	Fracciones colectadas		Reunión de fracciones		Claves usadas para las reuniones
CH ₃ CN - H ₂ O 70:30	24	23	1 - 3	1 - 4	TIRbC8 - F1
			4	5	TIRbC8 - F2
			5	6	TIRbC8 - F3
			6	7	TIRbC8 - F4
			7	8	TIRbC8 - F5
			8	9	TIRbC8 - F6
			9 - 10	10	TIRbC8 - F7
			11 - 24	11 - 23	TIRbC8 - F8

6.3. Elucidación estructural de los compuestos obtenidos

A partir de los resultados obtenidos del fraccionamiento químico de TIH mencionado previamente, se obtuvieron 5 compuestos que fueron elucidados para conocer su estructura química.

Los compuestos aislados, fueron analizados mediante RMN en un equipo Bruker advance III HD-600 a 600 MHz ¹H, ¹³C, además de análisis DEPT, COSY, HSQC y HMBC en CDCl₃. Excepto por el compuesto 1, solo los espectros de ¹H y se obtuvieron ¹³C RMN en Varian INOVA-400 a 400 MHz. Los cambios químicos son reportados en ppm en relación con TMS. La espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem Premier XE (Waters) equipado con una ionización Z-Spray (ESI). Operado en el modo de ión positivo (PI). Con los datos así generados, la elucidación estructural se llevó a cabo por el Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS-IMSS) (Fig. 8).

Compuesto 1 - 7-Isopreniloxicoumarina		
Posición	δ H	δ C
1		
2		160.76
3	6.14 (1H, d, 9.37 Hz)	112.27
4	7.58 (1H, d, 9.76 Hz)	143.16
5	7.29 (1H, d, 8.59 Hz)	128.40
6	6.74(1H, dd, 2.34, 8.59 Hz)	112.27
7		161.62
8	6.67(1H, d, 2.34 Hz)	100.99
9		155.28
10		111.95
1'	4.48 (1H, d, 6.63 Hz)	64.94
2'	5.37(1H, dd, 6.63, 6.63 Hz)	118.31
3'		138.54
4'	1.71, S	25.34
5'	1.68, S	17.80

Compuesto 2 - Herniarina (7-Metoxicoumarina)		
Posición	δ H	δ C
1		
2		161.12
3	6.24 (1H, d, 9.0 Hz)	113.04
4	7.63 (1H, d, 9.7 Hz)	143.36
5	7.37 (1H, d, 9.0 Hz)	128.71
6	6.83 (1H, dd, 2.08 Hz, 8.32 Hz)	112.52
7		162.79
8	6.80 (1H, d, 2.7 Hz)	100.80
9		155.86
10		112.48
7-O-CH ₃	3.87, S	55.86

Compuesto 3 - 7-Isoprenil-6-metoxicoumarina		
Posición	δ H	δ C
1		
2		161.40
3	6.24 (1H, d, 9.54 Hz)	113.19
4	7.60 (1H, d, 9.54 Hz)	143.26
5	6.84, S	108.12
6		146.62
7		152.11
8	6.81, S	101.09
9		149.85
10		111.25
1'	4.64 (1H, d, 6.60 Hz)	66.18
2'	5.47 (1H, dd, 6.60 Hz, 7.0 Hz)	118.53
3'		138.86
4'	1.77, S	25.71
5'	1.76, S	18.24
6-O-CH ₃	3.88, S	56.29

Compuesto 4 - Dimetilfraxetina (6,7,8-trimetoxi-coumarina)		
Posición	δ H	δ C
1		
2		160.39
3	6.32 (1H, d, 9.17 Hz)	114.3
4	7.60 (1H, d, 9.54 Hz)	143.38
5	6.67, S	103.8
6		150.11
7		145.96
8		141.14
9		143.03
10		115.12
6-O-CH ₃	3.89, S	56.31
7-O-CH ₃	3.98, S	61.44
8-O-CH ₃	4.02, S	61.77

Compuesto 5 - Escoparona (6,7-dimetoxicoumarina)		
Posición	δ H	δ C
1		
2		161.26
3	6.24 (1H, d, 9.54 Hz)	113.38
4	7.59 (1H, d, 9.54 Hz)	143.22
5	6.84, S	108.07
6		146.3
7		152.83
8	6.80, S	99.93
9		149.94
10		111.37
6-O-CH ₃	3.88, S	56.28
7-O-CH ₃	3.91, S	56.26

Fig 8. Datos de C13 y H⁺ de elucidación estructural. Se puede observar igualmente la estructura de cada uno de los compuestos (C1, C2, C3, C4 y C5) aislados del extracto hexánico de *Tagetes lucida*.

6.4. Ensayos farmacológicos

6.4.1. Animales de experimentación

Para la evaluación de la actividad anti-inflamatoria aguda y antineuroinflamatoria, se emplearon ratones macho adultos, con un peso promedio de 30 gr, provenientes de la empresa Envigo, S.A. de C.V. México. Permanecieron en cajas plásticas transparentes en el Bioterio del CIBIS-IMSS, al menos dos semanas antes de la experimentación, para su acondicionamiento, en un ambiente de 12 h de luz por 12 h de oscuridad, con acceso libre a su alimento (Pellets, Envigo, S.A. de C.V.). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana acerca del cuidado y Manejo de los Animales (NOM-062-ZOO-1999, México).

6.5. Material de laboratorio y reactivos

Se utilizó material de vidrio y equipo de laboratorio común; los modelos y marcas de los equipos utilizados se especifican en la metodología correspondiente. Las sustancias empleadas fueron de grado reactivo de las marcas Sigma, Aldrich. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, (PMFS $\geq 99\%$ (GC) de pureza, inhibidor de proteasas), LPS (lipopolisacárido de *Escherichia coli* 0111: B4, usado como inductor de neuroinflamación), 12-O-Tetradecanoilforbol 13-acetato, 4 β , 9 α , 12 β , 13 α , 20-Pentahydroxytigllia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate 13-acetate (TPA, $\geq 99\%$ (TLC) de pureza, inductor de inflamación auricular), meloxicam (MEL, 5 mg/kg, antiinflamatorio no-esteroideo usado para el ensayo de neuroinflamación), indometacina (INDO, 1 mg/oreja), tratamientos experimentales (C1 a C5, aislados de *T. lucida*).

6.6. Inflamación auricular inducida con TPA

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, por vía intraperitoneal -i.p.-) y se procedió de la manera que se describe a continuación: Los tratamientos se administraron en la oreja izquierda (OI), en un volumen total de 20 μ l, 10 μ l en la parte externa y 10 μ l en la interna. Se utilizó la oreja derecha (OD) de los ejemplares como control, ya que se administró de la misma manera el

disolvente que sirvió de vehículo para disolver cada uno de los tratamientos evaluados. Después de 5 min, en la oreja tratada, la OI, también se le colocaron (bajo el mismo diseño de administración) 20 µl de TPA a una concentración de 0.25 µg/ml (y una dosis por oreja de 0.005 µg/or) (Fig. 9). Los animales fueron colocados en sus cajas y después de 4 horas, fueron sacrificados por sobredosis anestésica. De cada uno de ellos, se tomaron secciones centrales de 6 mm de diámetro del pabellón auricular de ambas orejas y se calculó la diferencia de peso, entre ambas

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diferencial de peso del control negativo (mg)} - \text{el grupo de tratamiento (mg)}}{\text{Diferencial de peso del control negativo (mg)}} \times 100$$

para utilizarla como parámetro de inflamación, usando la siguiente ecuación:

Los grupos experimentales que se realizaron fueron los siguientes:

- **Control negativo (Veh):** Animales administrados con el TPA en la oreja izquierda y acetona como vehículo, en la oreja derecha.
- **Control positivo (Indo):** Animales administrados con el TPA e INDO (1mg/oreja).
- **Grupo Experimental 1 (TIH):** Animales administrados con TPA y extracto hexánico (1 mg/oreja).
- **Grupo Experimental 2 (TIAc):** Animales administrados con TPA y extracto acetónico (1 mg/oreja).
- **Grupo Experimental 3 (C1):** Animales administrados con TPA y compuesto 1 (1 mg/oreja).
- **Grupo Experimental 4 (C2):** Animales administrados con TPA y compuesto 2 (1 mg/oreja).
- **Grupo Experimental 5 (C3):** Animales administrados con TPA y compuesto 3 (1 mg/oreja).

- **Grupo Experimental 6 (C4):** Animales administrados con TPA y compuesto 4 (1 mg/oreja).
- **Grupo Experimental 7 (C5):** Animales administrados con TPA y compuesto 5 (1 mg/oreja).

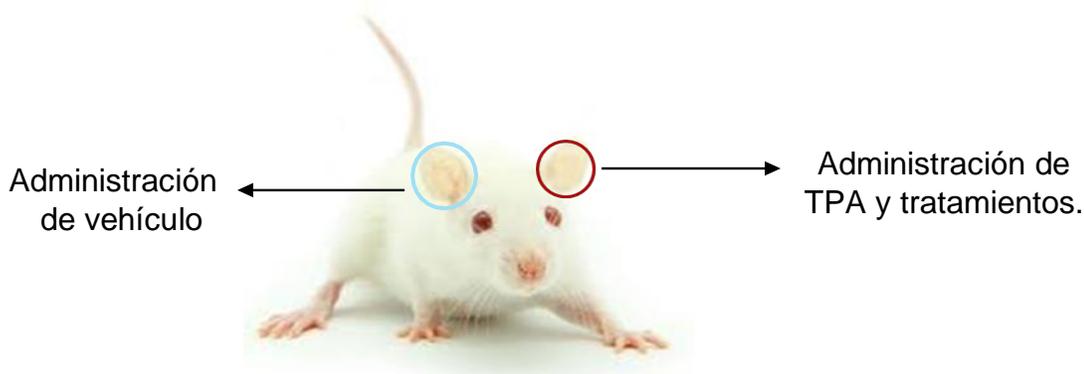


Figura 9. Descripción gráfica del procedimiento realizado para el modelo de inflamación auricular-inducida con TPA en ratones.

6.7. Neuroinflamación-inducida con LPS

Para llevar a cabo el desarrollo de este modelo, se indujo el daño al administrar LPS (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) vía i.p. durante 7 días, a excepción del grupo basal (animales sin daño). Posteriormente, a partir del octavo día, cada grupo recibió el tratamiento correspondiente durante 7 días por vía oral (v.o.). El día 13 del experimento se realizó el entrenamiento del paradigma de Campo abierto y el día 14, cuatro horas antes de ser sacrificados, se les administró una última dosis i.p. de LPS (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y 4 hrs antes de realizar la evaluación de la prueba de Campo abierto para observar su conducta exploratoria. Para este protocolo se utilizaron 6 grupos de 5 ratones:

- **Grupo (Basal):** Animales sin LPS, ni tratamiento.
- **Control negativo (Veh):** Animales a los que se les administró LPS (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) vía i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de vehículo (Tween 20 al 1 %) durante 7 días.

- **Control positivo (Mel):** Animales a los que se les administró LPS (25 µg/Kg) vía i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de Meloxicam (5 mg/kg) durante 7 días.
- **Grupo Experimental 1 (TIH):** Animales a los que se les administró LPS (25 µg/Kg) vía i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. del extracto hexánico de *Tagetes lucida* (10 mg/kg) durante 7 días.
- **Grupo Experimental 2 (C1):** Animales a los que se les administró LPS (25 µg/Kg) vía i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. del compuesto aislado 1 de *Tagetes lucida* (C1) (2 mg/kg) durante 7 días
- **Grupo Experimental 3 (C2):** Animales a los que se les administró LPS (25 µg/Kg) vía i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. del Compuesto aislado 2 de *Tagetes lucida* (C2) (2 mg/kg) durante 7 días.

Una vez realizada la evaluación de la actividad motora espontánea en el campo abierto, se sacrificaron los animales, siguiendo la NOM-062, por una sobreexposición al anestésico volátil cloroformo, para proceder con la disección cerebral y la extracción del bazo. Los órganos fueron almacenados a -4 °C para su posterior homogenización y cuantificación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias mediante la técnica de ELISA (ver adelante).

6.8. Conducta motora espontánea en campo abierto (CA)

Los ratones con neuroinflamación inducida con LPS, fueron sometidos a la prueba de CA. La prueba consistió en colocar a los animales dentro de una caja de acrílico con 9 cuadrantes marcados en el piso (Fig. 10). Se midió su conducta motora, mediante el conteo de los cruces totales (CT) y la conducta exploratoria contando los elevamientos verticales (EV) durante cinco minutos que dura el ensayo.

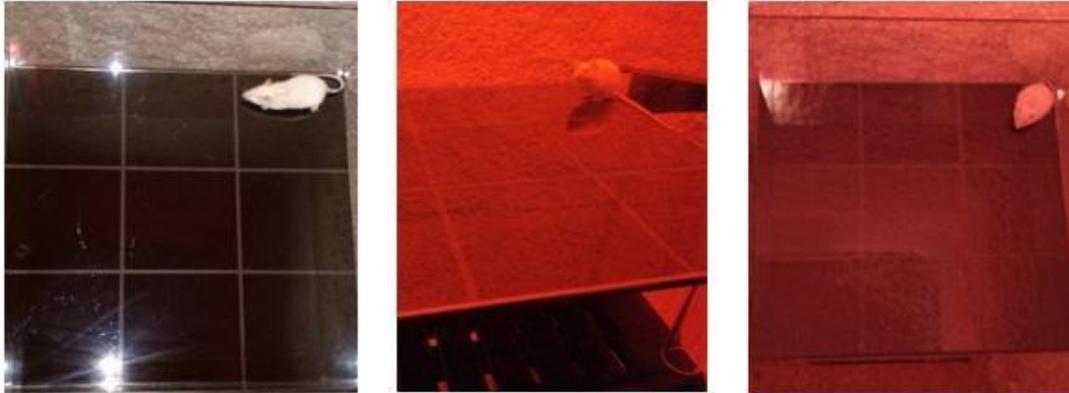


Figura 10. Fotografías de ratones con neuroinflamación sometidos a la prueba de campo abierto.

6.9. Cuantificación de citocinas a través del método de ELISA

El cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación inducida con LPS, fueron disgregados en un amortiguador de fosfatos a pH=7 con inhibidor de proteasas (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo, PMFS), para posteriormente ser centrifugados durante 7 minutos a 14,000 rpm. Se colectó el sobrenadante que fue almacenado a -70°C para su posterior análisis en la cuantificación de las citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α , e IL-10, usando la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés: *Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay*, o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), siguiendo la técnica de fabricante (Thermo scientific).

7. Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron de las pruebas antes descritas fueron analizados con el programa de estadística SPSS versión 11.0, a través de un análisis de varianza (ANOVA) y una post-prueba de Bonferroni para los ensayos de inflamación aguda y de actividad motora. Para las pruebas de neuroinflamación, ELISA e índice de órganos se usó *t-student*.

8. Resultados

8.1. Efecto de *Tagetes lucida* sobre inflamación aguda inducida con TPA

Los resultados obtenidos de la administración local del irritante TPA se muestran en la figura 11. El grupo control negativo, al cual se le administró TPA y acetona como vehículo (Veh), presentó un edema de 11.8 mg. En el caso de la oreja de los ratones que recibieron Indometacina como tratamiento, se contrarrestó el efecto inflamatorio de manera significativa respecto al grupo Veh ($p < 0.05$). El tratamiento de la oreja con TIAC y TIH a 1 mg/oreja, redujo significativamente la inflamación respecto al grupo Veh ($p < 0.05$), siendo más evidente en el grupo TIH. Por lo que se decidió realizar una separación química de dicho extracto.

La metodología química realizada permitió aislar 5 compuestos diferentes, los cuales fueron evaluados en el ensayo de edema auricular y los resultados se observan también en la figura 11 A. El compuesto C1, fue capaz de disminuir significativamente el edema local inducido con TPA en comparación con el grupo Veh ($p < 0.05$). El mayor porcentaje de inhibición de la inflamación lo ejerció el extracto TIH con un 92% de efecto, seguido del compuesto C1 con 81%, después el compuesto C2, rebasa ligeramente el 50% de inhibición, los demás tratamientos sólo disminuyen el parámetro en valores menores al 50% (Figura 11 B).

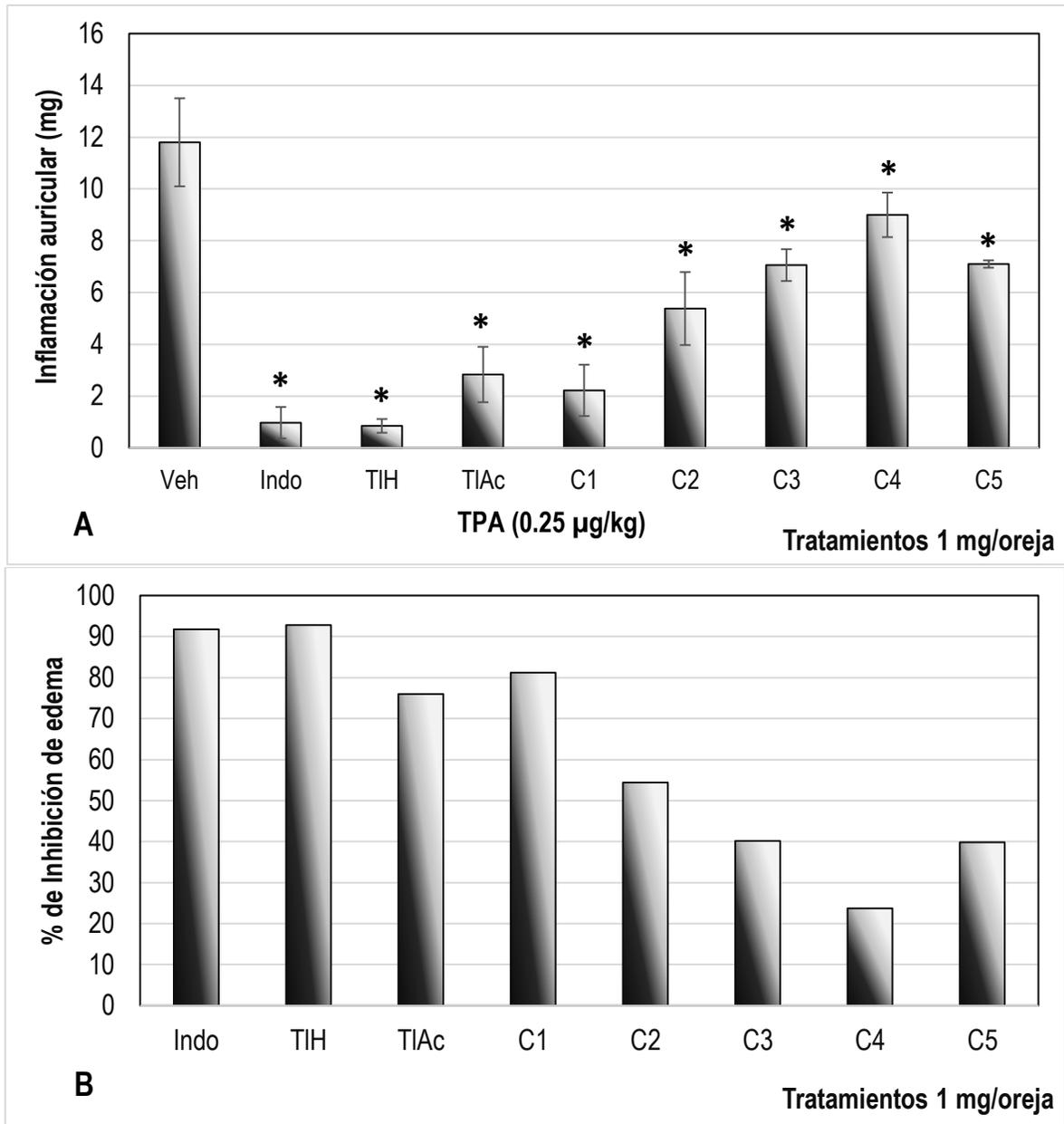


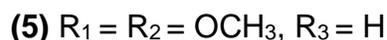
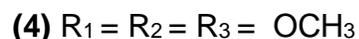
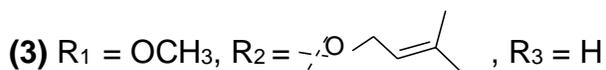
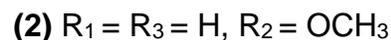
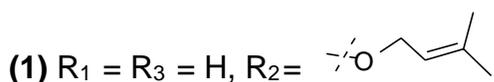
Fig 11. Efecto de la administración local del extracto acetónico (TIAc), hexánico (TIH) y de los compuestos aislados (C1 a C5) de *T. lucida*, sobre la inflamación auricular (**A**) inducida con el ester de forbol TPA y el porcentaje de inhibición (**B**). Indometacina=indometacina; Veh= acetona+TPA. ANOVA (n=5, X±DE), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de* $p \leq 0.05$ cuando se compara con el Veh.

8.2. Elucidación estructural de los compuestos aislados de *Tagetes lucida*

De acuerdo con la metodología antes señalada y basado en el efecto anti-inflamatorio en el ensayo agudo (TPA), el extracto TIH fue químicamente separado (cuadros 1 al 8, sección metodología) y fueron detectados, aislados y purificados 5 compuestos, que fueron analizados por diferentes técnicas espectrométricas como RMN de C13 y H+, para su elucidación estructural, los datos indicaron que todos los compuestos son del tipo de las cumarinas.

El análisis de la elucidación estructural fue realizado por el Dr. Manasés González Cortázar, con quien se estuvo muy de cerca para el aprendizaje de dicho análisis. Los datos fueron comparados con la literatura existente, debido a que algunos de ellos son metabolitos ya reportados (Cardona *et. al.*, 1992; Céspedes *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2016). Tres de ellos ya se habían encontrado en esta especie, y dos se reportan aquí como nuevas cumarinas iso-preniladas (la 1 y la 3) en *Tagetes lucida*.

A continuación, se muestra la estructura base de las cumarinas, la letra **R** señala el radical que se sustituye en cada posición y le da el nombre a cada compuesto. También son indicadas las tablas de cada compuesto, en las que se indican los desplazamientos químicos tanto por protón H+ (δ H) y de carbono (δ C), cada uno de estos parámetros corresponden a la posición de los carbonos en una estructura química que permite ir construyendo la estructura (que se muestra debajo de cada dato).



El compuesto 1 se obtuvo como un precipitado blanco amorfo. En el espectro de luz ultravioleta (UV), el compuesto mostró δ max de 203, 219 y 320 nm. El espectro de masas (MS) dio un pico molecular correspondiente en m/z 231.17 a la fórmula molecular $[C_{14}H_{14}O_3 + H]^+$. El espectro de RMN 1H exhibió las mismas señales que el compuesto 3 de una cumarina, con la excepción de una única sustitución en el anillo aromático por la presencia de un sistema de giro ABX en δ 7.29 (1H, d, 8.5 Hz, H-5), 6.74 (1H, dd, 2.3, 8.5 Hz, H-6) y 6.67 (1H, d, 2.3 Hz, H-8)

correspondientes a H-5, H-6 y H-8 respectivamente. El sustituyente fue identificado como una unidad de isopreno, esto fue corroborado por la comparación de los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y las correlaciones observadas. De acuerdo con el análisis de los datos de RMN 1H y ^{13}C y su comparación con los datos descritos anteriormente (Chang 1977), este compuesto se identificó como isopreniloxicumarina o 7-O-prenil-umbeliferona (C1). Las cumarinas 2, 4 y 5 compararon sus datos espectroscópicos (RMN de 1 y 2 dimensiones) y espectrometría (MS) con los descritos en la literatura (Chang 1997, Osborne 1989) y se identificaron como 7-metoxicoumarina o herniarina, dimetilfraxetina o 6, 7,8-trimetoxicoumarina y escoparona o 6,7-dimetoxicoumarina respectivamente.

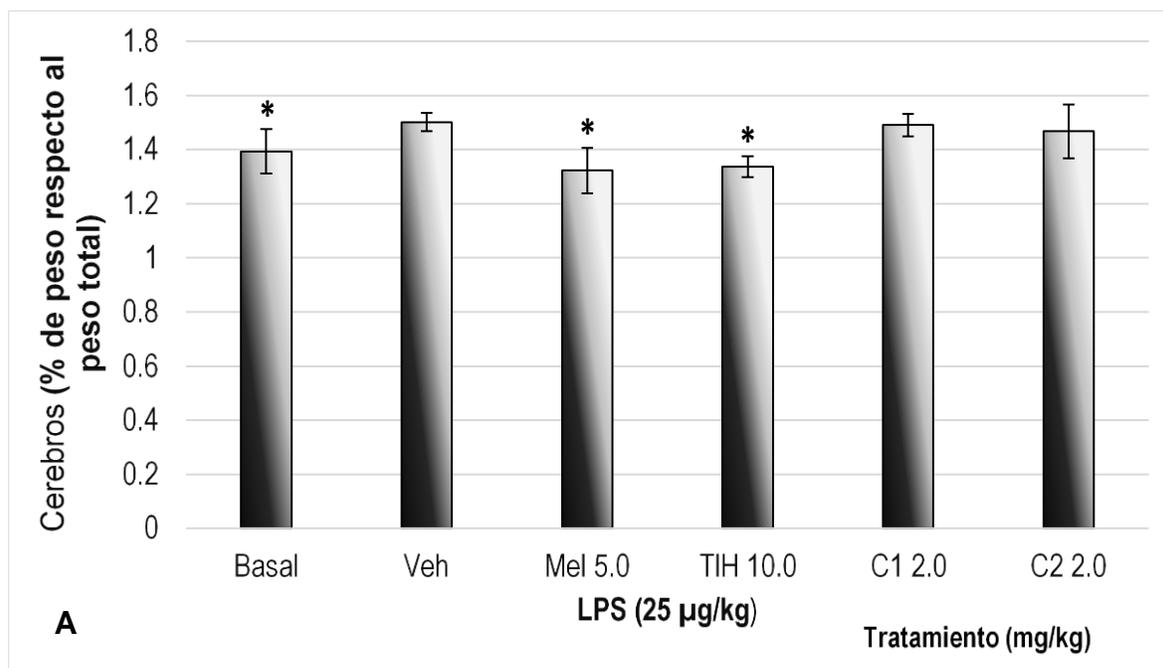
El compuesto 3 se obtuvo como un precipitado blanco amorfo. En el espectro de luz ultravioleta (UV), el compuesto mostró δ max de 251, 294 y 344 nm. El espectro de masas (MS) dio un pico molecular correspondiente en m / z 261.16 a la fórmula molecular $[C_{15}H_{15}O_4 + H]^+$. El espectro de 1H NMR exhibió dos señales de anillo aromático singulares en δ 6.84 (1H, s) y 6.81 (1H, s) y un doble enlace en δ 6.24 (1H, d, 9.5 Hz) y 7.6 (1H, d, 9.5 Hz) correspondientes a H-5, H-8, H-4 y H-3 respectivamente, de un esqueleto cumarina del tipo benzopirona, con dos sustituyentes uno metoxilo en δ 3.88 (3H, s) que se correlaciona con la señal de carbono en HMBC en δ 146.62, asignado a C-6 y una señal de base de oxígeno y de acuerdo con el experimento DEPT corresponde a un CH_2^- en δ 4.64 (2H, d, 6.6 Hz, H-1'a y H-1'b) que se correlaciona en HMBC con la señal en δ 152.11 asignada

C-7 de la aglicona. La señal de protones de H-1' (δ 4.64) mostró un acoplamiento con un doble de señal doble en δ 118.53 y que se asigna a un doble enlace C-2', que se correlaciona en HMBC con tres señales de carbono: una con dos metilos en δ 25.27 y 18.24 asignados a C4' y C-5' respectivamente, y otro con cuaternario en 138.86 asignó un C-3N'. Por lo tanto, se determinó que esta es una unidad de isopreno. Según estos análisis de los datos de RMN 1H y 13C y su comparación con los datos descritos anteriormente (Cardona, 1992), este compuesto se identificó como 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina o 7-O-prenil-escopoletina (3).

8.3. Efecto de *Tagetes lucida* en ratones con neuroinflamación-inducida con LPS

8.3.1. Índice de peso de bazo y cerebro

El cerebro y el bazo fueron pesados y se calculó su índice en porcentaje respecto al peso total del individuo. En la figura 12 A, se puede observar que el porcentaje del cerebro en ratones que recibieron sólo LPS que corresponde al control negativo (Veh), fue mayor que aquel que se obtuvo del grupo basal. La administración oral del antiinflamatorio no esteroideo meloxicam (Mel), redujo dicho el parámetro. En lo



referente a los tratamientos de *Tagetes lucida*, el extracto TIH es el único que redujo el índice de este órgano respecto al grupo Veh ($p<0.05$). En el bazo (figura 12 B) también se observa un incremento significativo entre el grupo Veh y el de los individuos sanos (basal) ($p<0.05$). Cuando el meloxicam fue administrado, se pudo observar una disminución significativa, respecto al Veh ($p<0.05$). Todos los tratamientos de *Tagetes lucida* indujeron un incremento en el índice de peso del bazo ($p<0.05$).

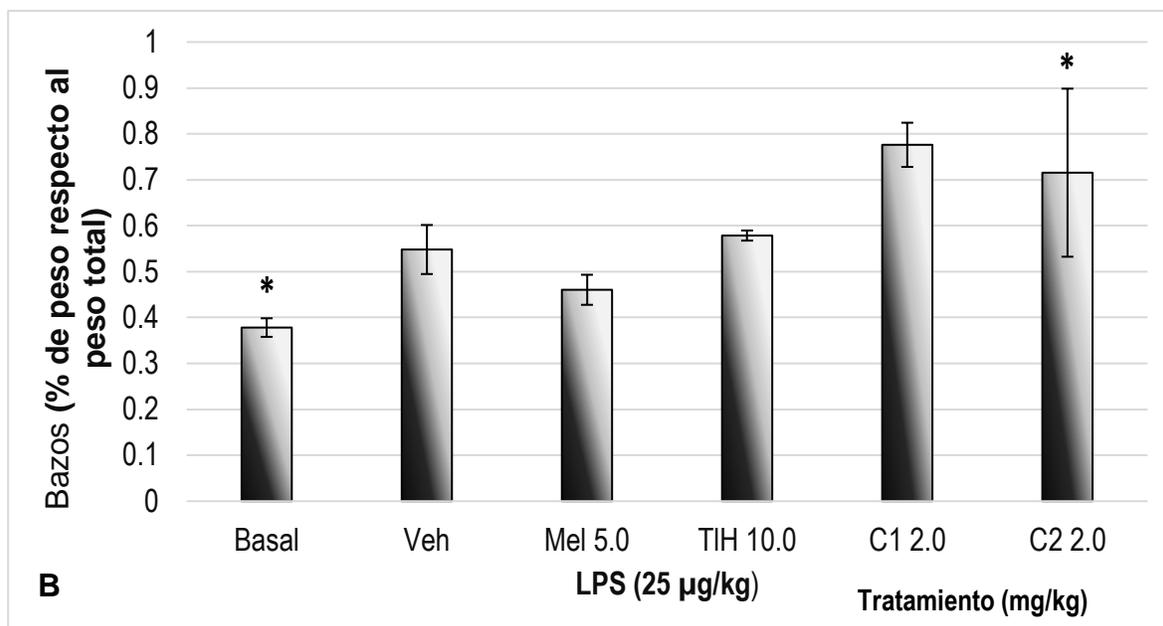


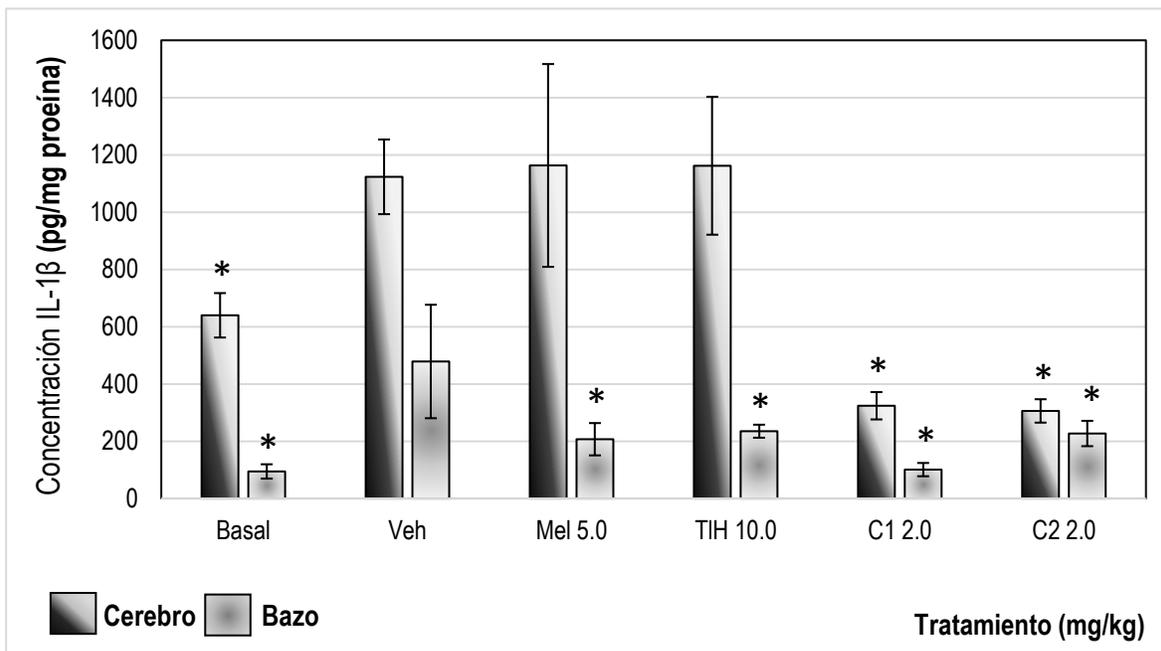
Fig 12. Efecto de la administración oral del extracto acetónico (TIAC), hexánico (TIH) y de los compuestos aislados de *T lucida*, sobre el porcentaje de peso de cerebro (A) y de bazo (B), de ratones con neuroinflamación inducida con LPS. LPS=lipopolisacárido+vehículo. ANOVA (n=8, $X\pm DE$), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de $*p\leq 0.05$ cuando se compara con el LPS.

8.4. Efecto de *Tagetes lucida* sobre concentración de citocinas en ratones con neuroinflamación inducida con LPS

8.4.1. IL-1 β

En lo que se refiere a la interleucina IL-1 β en cerebro, la administración de LPS aumentó significativamente la concentración de dicha citocina en el grupo Veh (Figura 13, $p<0.05$). En comparación con el grupo Veh, todos los tratamientos redujeron significativamente la concentración de IL-1 β , observándose un mayor

efecto en los grupos que recibieron C1 y C2, de hecho, estos dos compuestos provenientes de *Tagetes lucida*, disminuyen la concentración por debajo de la



observada en el grupo de aquellos individuos sin daño (Grupo basal) ($p < 0.05$). Por su parte, el tratamiento con Meloxicam administrado a 5.0 mg/kg y el TIH a 100 mg/kg no presentaron un cambio significativo en la concentración cerebral de IL-1 β y fueron semejantes al grupo Veh ($p < 0.05$). Sin embargo, en el bazo todos los tratamientos redujeron la concentración de IL-1 β en comparación con el grupo Veh (Fig. 13; $p < 0.05$).

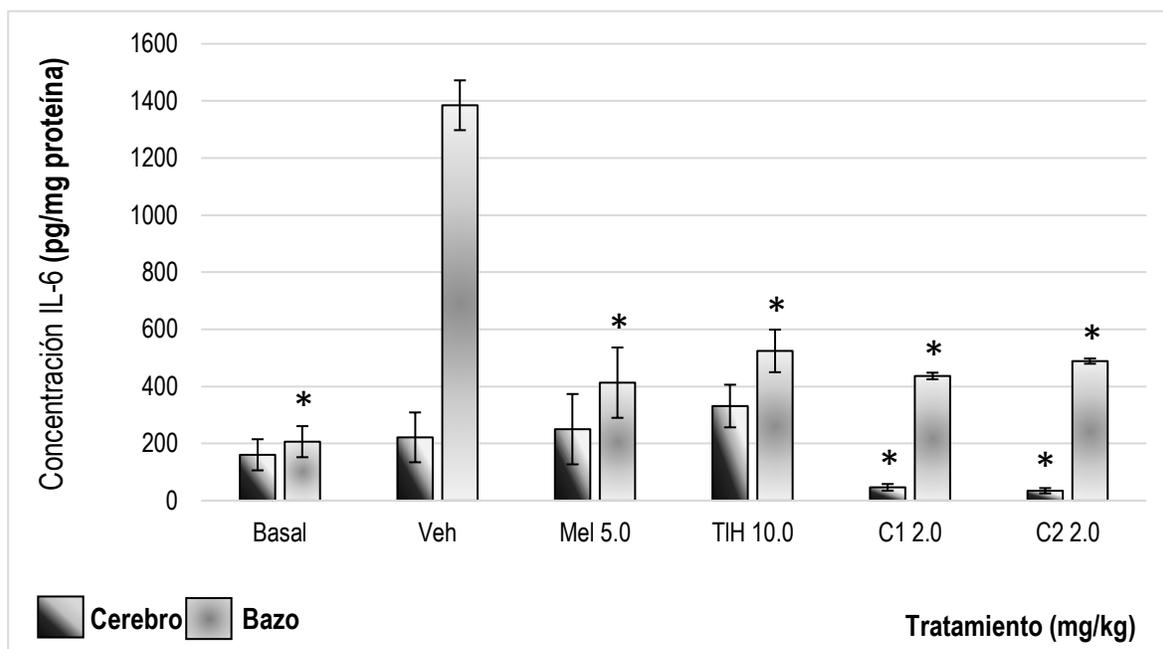
Figura 13. Efecto de la administración oral del extracto hexánico (TIH), de C1 (7-isopreniloxicumarina) y C2 (herniarina) de *T. lucida*, sobre la concentración de IL-1 β en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación inducida con LPS. ANOVA ($n=8$, $\bar{x} \pm DE$), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de $*p \leq 0.05$ cuando se compara con el grupo con sólo LPS (Veh).

8.4.2. IL-6

La administración de LPS no indujo un efecto sobre la concentración de la citocina pro-inflamatoria IL-6 en cerebro, ya que el grupo Veh no tuvo diferencias significativas comparado con los grupos basal, Meloxicam y TIH ($p < 0.05$) (Fig. 14).

Sin embargo, la administración de los compuestos C1 y C2 muestran una reducción significativa en la concentración de dicha citocina ($p < 0.05$).

A diferencia de lo observado en cerebro, IL-6 aumentó significativamente su concentración en el bazo del grupo Veh como respuesta de la administración del



LPS ($p < 0.05$) (Fig. 14). Se pudo observar que, en el bazo, la administración de los diferentes tratamientos (Meloxicam, TIH, C1 y C2), así como el grupo basal, produjo una disminución significativa de esta citocina en comparación al grupo Veh ($p < 0.05$).

Figura 14. Efecto de la administración oral del extracto hexánico (TIH), de C1 (7-isopreniloxicumarina) y C2 (herniarina) de *Tagetes lucida*, sobre la concentración de IL-6 en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación inducida con LPS. ANOVA ($n=8$, $\bar{x} \pm DE$), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de $*p \leq 0.05$ cuando se compara con el grupo con sólo LPS (Veh).

8.4.3. IL-10

En la figura 15 se muestra que, en cerebro, la administración LPS indujo un aumento significativo de la citocina antiinflamatoria IL-10 en el grupo de Meloxicam (Mel) en comparación con el grupo control negativo (Veh) ($p < 0.05$). Los grupos basal y TIH fueron estadísticamente semejantes al grupo Veh. La menor concentración de esta

citocina en cerebro se observó en los grupos correspondientes a C1 y C2 en comparación con el grupo control negativo (Veh) ($p < 0.05$).

Por otro lado, la concentración de IL-10 inducida con LPS en bazo, indica que no hay diferencias significativas entre los grupos Mel, TIH y C2 y el grupo Veh ($p < 0.05$). Los valores más bajos, comparados con el grupo Veh, fueron observados en los grupos basal y C1, los cuales fueron estadísticamente semejantes ($p < 0.05$, Fig. 15).

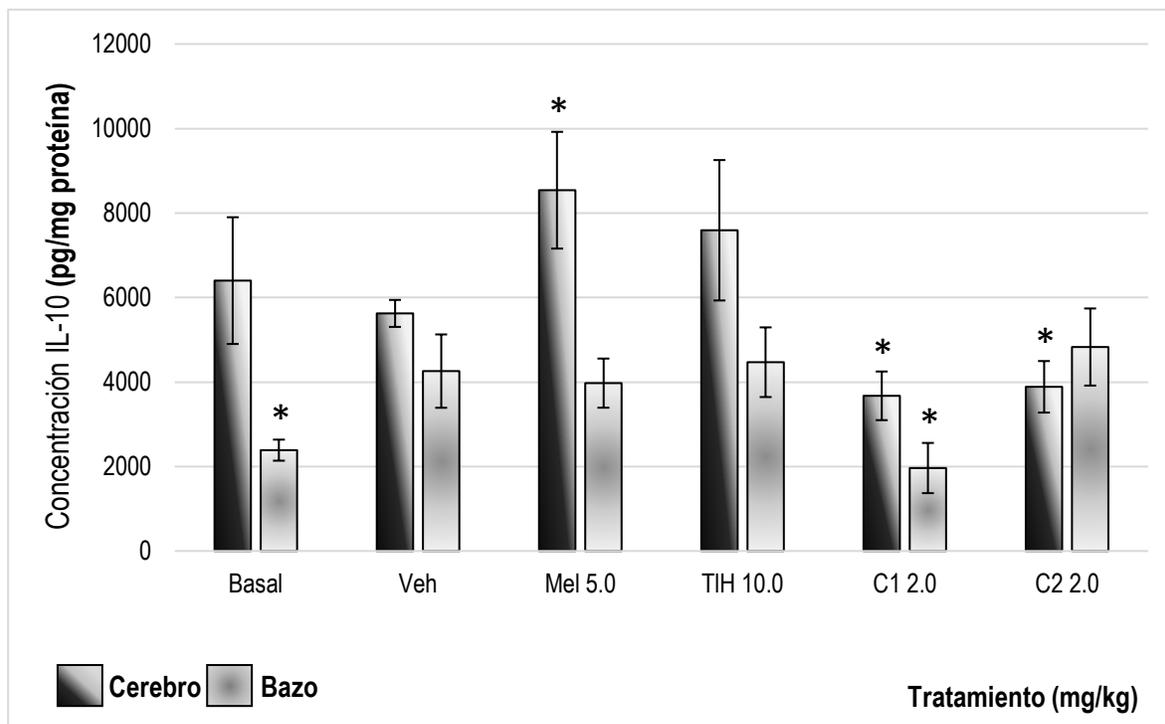


Figura 15. Efecto de la administración oral del extracto hexánico (TIH), de C1 (7-isopreniloxicumarina) y C2 (herniarina) de *T. lucida*, sobre la concentración de IL-10 en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación inducida con LPS. ANOVA ($n=8$, $\bar{x} \pm DE$), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de $*p \leq 0.05$ cuando se compara con el grupo con sólo LPS (Veh).

8.4.4. TNF- α

La figura 16 muestra que la concentración cerebral de TNF- α significativamente menor fue la del grupo basal ($p < 0.05$), los grupos C1 y C2 mostraron un comportamiento semejante al grupo basal ya que no hubo diferencias significativas

y estos tres grupos fueron diferentes al grupo Veh ($p < 0.05$). Los tratamientos TIH y Mel no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo Veh.

La concentración de TNF- α en bazo inducida con LPS (Fig. 16), indujo un aumento significativo en los grupos Mel y TIH, los cuales fueron estadísticamente semejantes ($p < 0.05$). No se observó diferencias significativas entre los grupos basal, C1 y C2 en comparación al grupo Veh ($p < 0.05$).

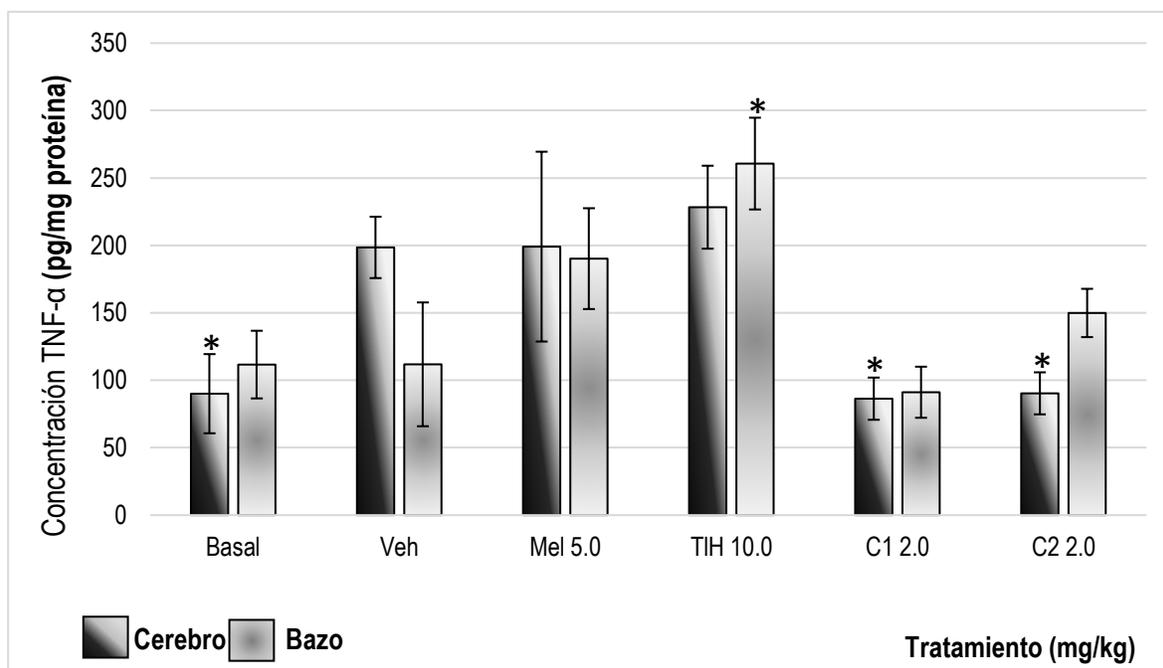


Figura 16. Efecto de la administración oral del extracto hexánico (TIH), de C1 (7-isopreniloxicumarina) y C2 (herniarina) de *Tagetes lucida*, sobre la concentración de TNF- α en cerebro y bazo de ratones con neuroinflamación inducida con LPS. ANOVA ($n=8$, $\bar{x} \pm DE$), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de $*p \leq 0.05$ cuando se compara con el grupo con sólo LPS (Veh).

8.4.5. Efecto de *Tagetes lucida* sobre la conducta de ratones con neuroinflamación en campo abierto (CA)

La evaluación de la conducta motora permitió observar que en el parámetro de cruces totales (CT), el grupo basal, Meloxicam (Mel), TIH y C2 no presentan diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo Veh (control negativo) ($p < 0.05$). El grupo C1 reduce significativamente dicho parámetro comparado con el grupo Veh ($p < 0.05$). Todos los tratamientos y el grupo basal

fueron estadísticamente semejantes con el grupo Veh en el parámetro de elevamientos verticales (EV) (Figura 17).

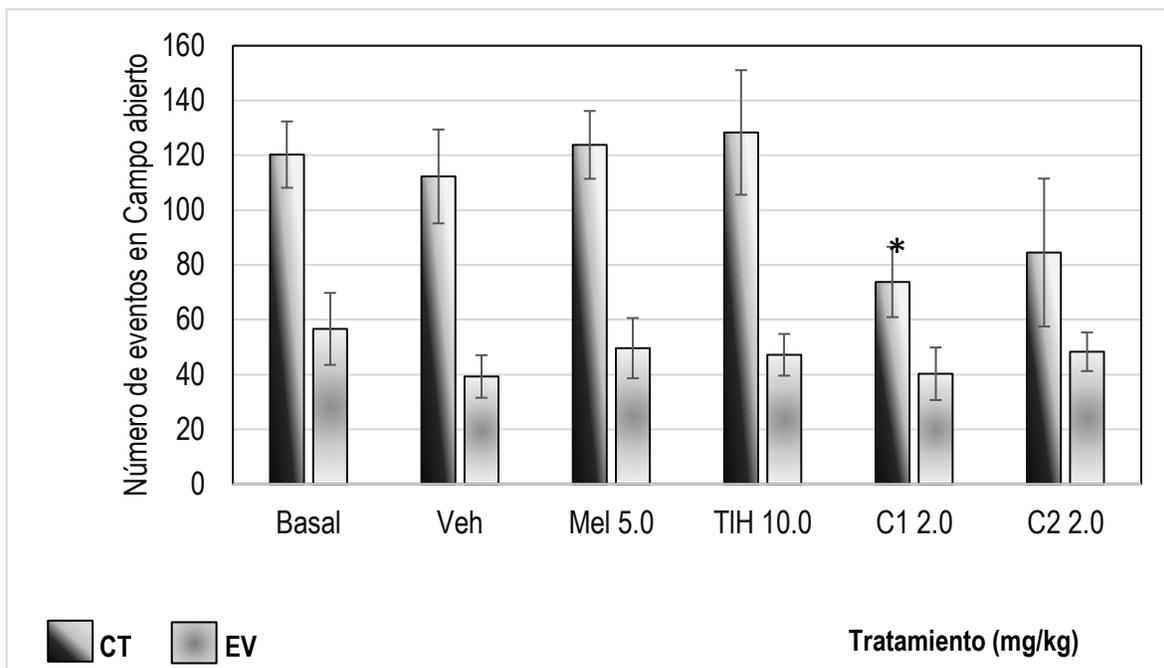


Fig 17. Efecto de la administración oral del extracto acetónico (TIAc), hexánico (TIH) y de los compuestos aislados de *Tagetes lucida*, sobre los parámetros de cruces totales (CT) y elevamientos verticales (EV) que realizan los ratones con neuroinflamación inducida con LPS, en el campo abierto (CA). LPS=lipopolisacárido+vehículo. ANOVA (n=8, X±DE), post-prueba Bonferroni con un nivel de significancia de * $p \leq 0.05$ cuando se compara con el LPS.

9. Discusión

Tagetes lucida es una planta ampliamente usada en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades sobre el sistema nervioso central y su efecto en enfermedades que tienen un fondo inflamatorio. Se han descrito estudios farmacológicos de la planta como antidepresivo, ansiolítico y sedante (Aquino, 2002; Pérez *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, se realizó un estudio sobre sus posibles propiedades como agente antiinflamatorio y más específicamente en la neuroinflamación, usando un modelo de administración sistémica de LPS. Los resultados obtenidos indican que la planta posee diferentes tipos de compuestos a los cuales se les puede atribuir la actividad antiinflamatoria, sin embargo, los datos químicos y el seguimiento farmacológico llevaron al aislamiento de compuestos del tipo de las cumarinas.

La actividad antiinflamatoria de *Tagetes lucida* no había sido descrita y confirmada hasta ahora. En el presente trabajo, se demostró, como se observa en la figura 11, que el extracto TIH redujo mejor el edema inducido con TPA en comparación con TIAc, razón por la que se utilizó dicho extracto para llevar a cabo un fraccionamiento químico, el cual permitió aislar y caracterizar cinco compuestos cumarínicos (**1-5**) (Fig. 8). Uno de ellos, la 7-isopreniloxicumarina o 7-O-prenyl-umbelliferone (**1**), el cual posee un grupo isoprenilo en el C-7, fue el más activo en el modelo de inflamación inducida con TPA al inducir un 81% de inhibición de edema (Fig. 11B). La isopreniloxicumarina junto con otra cumarina denominada umbeliferona fueron aisladas de *Haplopappus multifolius* y se evaluó su capacidad de inhibir a la enzima lipooxigenasa 15 (15-sLOX), la cual cataliza la biosíntesis de leucotrienos y lipoxinas a partir del ácido araquidónico. Cabe resaltar que la diferencia entre dichos compuestos reside en el C-7 (Fig. 8), ya que la umbeliferona posee un grupo OH en lugar del grupo isoprenilo. Dicho cambio en la estructura química podría explicar la razón por la cual la 7-isopreniloxicumarina solo inhibió la actividad de 15-sLOX en un 23% mientras que la umbeliferona en un 37% (Torres *et al.*, 2013).

Existen estudios en los cuales se indica que las cumarinas conocidas como herniarina (**2**) y escoparona (**5**) poseen actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica (Céspedes *et al.*, 2006; Mejía-Barajas, 2012). En la figura 11B se observa que la herniarina administrada, a una dosis de 1 mg/oreja, redujo medianamente el edema auricular en un 54%. Este compuesto fue aislado por primera vez a partir de *Santolina oblongifolia* (Merichi, *et al.*, 1990) y también ha sido reportado que posee un efecto antiinflamatorio debido a una inhibición en la liberación de la prostaglandina E₂ (PGE₂) en macrófagos de ratón estimulados con un ionóforo de calico (Silván *et al.*, 1996). El compuesto 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina (**3**) también fue capaz de reducir el edema auricular, aunque solo en un 40%, un estudio realizado con este compuesto menciona su capacidad de inhibir la mortalidad de las pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) hasta en un 60% (Vera *et al.*, 2006). Sin embargo, no existe a la fecha algún otro reporte en el que se mencione su actividad antiinflamatoria. La escoparona (**5**), en este trabajo, también tuvo una actividad antiinflamatoria moderada, pero se ha demostrado que éste compuesto puede inhibir la producción, inducida con LPS, de citocinas proinflamatorias en células microgliales BV-2 y que dicho efecto lo realiza a través de la regulación de IRF-3 y ERK's (Cho *et al.*, 2016).

Mientras que la dimetilfraxetina (6,7,8-trimetoxicumarina, **4**), fue la menos activa. De ésta se reporta que, en una mezcla con otras cumarinas, tiene efecto ansiolítico y sedante en ratones (Pérez-Ortega *et al.*, 2016), también se le ha demostrado efecto gastroprotector (Son *et al.*, 2015).

El efecto antiinflamatorio que mostraron las cumarinas evaluadas en el modelo de edema auricular inducido con TPA, indica que la estructura básica de estos compuestos se relaciona directamente con la actividad antiinflamatoria ya que, por ejemplo, entre los compuestos **1** y **2**, el grupo isoprenilo en la posición C-7 le confiere un efecto más potente a **1**. La cumarina **2** posee dos radicales en las posiciones C-6 y C-7 e independientemente del grupo isoprenilo y metoxilo, el efecto

observado fue menor en comparación de **1**, cabe señalar en este punto que estos resultados fueron ya publicados en 2019 (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2019).

Por otro lado, la neuroinflamación se considera parte crucial de los procesos de daño asociados a la neurodegeneración, el cual conduce a la muerte y al daño cognitivo progresivo. Las citocinas proinflamatorias como $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e $IL-6$, están relacionadas con la detonación de los procesos patológicos, causando la exacerbación del daño y mantienen activada a la microglia promoviendo el progreso de la patofisiología asociada a la neuroinflamación (Bronzuoli *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado previamente, el extracto TIH y los compuestos **1** y **2**, obtenidos a partir de *Tagetes lucida*, fueron los de mayor actividad antiinflamatoria y, en consecuencia, los seleccionados para llevar a cabo el estudio de neuroinflamación inducida con LPS. Al ser un componente presente en la membrana de bacterias Gram negativas, el LPS provoca la activación del sistema inmunológico de los individuos a los cuales es administrado, dicha molécula ocasiona alteraciones en el comportamiento y la memoria, así como una abundante generación de EROS y peroxidación de lípidos, lo que produce como consecuencia, daño cerebral oxidante. Es importante destacar que en el cerebro produce una activación glial que libera diversas citocinas proinflamatorias, las cuales están implicadas en diversos trastornos neurodegenerativos tales como la EA, enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral y esclerosis múltiple (Muhammad *et al.*, 2019).

Como resultado de la administración sistémica de LPS, se observó un incremento significativo en los índices de peso de cerebro y bazo, parámetro utilizado para la medición de la inflamación producida en los órganos de los individuos a los que les fue administrado el LPS con respecto a aquellos que no recibieron dicho estímulo. El incremento en el peso relativo coincide con un reporte previo de Zhou y colaboradores de 2017, en el cual indican que como resultado del modelo de inflamación inducida con LPS, obtuvieron un incremento en el índice de peso de los órganos evaluados, así como una mayor concentración de las citocinas

proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Como se observa en la figura 12A, el tratamiento con meloxicam y el extracto TIH tienen la capacidad de disminuir este parámetro en el cerebro, mientras que los compuestos **1** y **2** no presentan cambios significativos con respecto al grupo de daño. En lo concerniente al bazo, es posible observar en la figura 12B, que únicamente el tratamiento con el compuesto **1** presenta diferencias significativas, aumentando el índice de peso de este órgano.

Para la determinación de la inflamación producida a nivel bioquímico en los órganos antes mencionados, se llevó a cabo una cuantificación de las citocinas de mayor relevancia en procesos neuroinflamatorios. De esta manera, se observó que los animales pertenecientes al grupo de daño, es decir, aquellos que recibieron LPS de manera sistémica, pero sin tratamiento, mostraron elevadas concentraciones de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en cerebro y bazo. Por su parte, la IL-10 mostró una concentración más elevada en el bazo de los individuos, pero sin cambios significativos en los niveles de esta citocina presentes en el cerebro respecto al grupo basal. Estos resultados concuerdan con la información proporcionada por diversos autores que señalan que existe una activación del sistema inmune ante la presencia de LPS en el organismo, lo que produce neuroinflamación en los individuos. Esta idea surge a partir de observaciones neuropatológicas, principalmente en la EA, la cual es una forma prototípica de proteopatía del SNC. Dicha proteopatía se asocia con la acumulación del péptido A β y ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína tau. Algunos de los receptores expresados por la glía residente del SNC han sido implicados para la detección de proteínas anormales. Se ha demostrado que los receptores Fc y los receptores tipo Toll (TLR) se unen al péptido A β para desencadenar la liberación de una serie de citocinas como IL-6, IL-1 β y TNF- α , produciendo una inflamación crónica, que genera un gran impacto en funciones cognitivas y que puede afectar el metabolismo de la proteína precursora amiloide (PPA) (Brown *et al.*, 2010; Azizi y Mirshafiey, 2012; Becher *et al.*, 2016; Domínguez *et al.*, 2017).

Debido a los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede inferir que los tratamientos derivados de *Tagetes lucida*, TIH, C1 y C2, podrían poseer actividades inmunomoduladoras. Como se observa en la figura 13, el tratamiento con TIH disminuye significativamente la concentración de la citocina IL-1 β en el bazo, aunque no así en el cerebro. Por otro lado, los tratamientos con C1 y C2 disminuyen la concentración de esta citocina tanto en bazo como en cerebro. Es importante mencionar que la administración de ambos compuestos provoca una disminución en la concentración de IL-1 β que se encuentra por debajo de los niveles observados en el grupo basal. Respecto a la citocina IL-6, se observa en la figura 14 que los tratamientos con TIH, C1 y C2 tuvieron una disminución significativa de la concentración de esta citocina en el bazo, sin embargo, se observa un ligero incremento de los mismos respecto al grupo basal. En lo concerniente a la concentración de IL-6 en el cerebro, el tratamiento con TIH no produjo cambios significativos, pero se aprecia una disminución respecto al grupo de daño en los grupos tratados con C1 y C2, la concentración de esta citocina es incluso ligeramente menor con respecto al grupo basal. La última citocina proinflamatoria evaluada en el presente estudio, es decir, TNF- α , también mostró una disminución significativa en la concentración cerebral con el tratamiento C1 y C2. Por otra parte, el tratamiento con TIH no produjo cambios significativos en los niveles observados de esta citocina en el órgano en cuestión. Sin embargo, sí tuvo una diferencia significativa en la concentración de TNF- α en el bazo, aumentando los niveles de la misma por encima del grupo de daño. C1 y C2 no mostraron diferencias significativas con esta citocina en bazo. Por último, en la figura 15 se pueden observar los resultados obtenidos en la concentración de IL-10, la citocina antiinflamatoria evaluada en este estudio, en la que el grupo TIH no obtuvo diferencias significativas en ninguno de los órganos evaluados, pero es posible apreciar diferencias significativas de C1 en los niveles de esta citocina antiinflamatoria en ambos órganos, mientras que C2 únicamente tuvo diferencia significativa en cerebro. En ambos tratamientos con compuestos puros, se observó

una disminución de la concentración de IL-10 en cerebro por debajo de los niveles mostrados por el grupo basal.

Como se ha mencionado con anterioridad, en estudios previos se ha observado que tanto la IL-1 β como la IL-6 podrían jugar roles importantes a nivel sistémico para la promoción de la función patogénica de las células Th capaces de inducir inflamación en el SNC, asimismo se reporta que IL-1 β es una citocina clave asociada con la neurodegeneración. También es importante señalar que diversos estudios indican que el TNF- α actúa de manera sinérgica con el IFN γ , lo que resulta en la expresión de MHC en astrocitos y oligodendrocitos, lo que puede llegar a aumentar la susceptibilidad de estos componentes de la glia a la citotoxicidad mediada por células T CD8+. Razón por la cual, la disminución en la concentración de estas citocinas resulta prometedor (Qin *et al.*, 2008; Becher *et al.*, 2016).

La disminución en la concentración de la citocina IL-10 en los tratamientos con C1 y C2 puede tener una relación directa con la baja concentración de citocinas proinflamatorias obtenidas, ya que la concentración de las mismas depende de una retroalimentación negativa con IL-1 β , IL-6 y TNF- α . La disminución obtenida en este parámetro resulta prometedora ya que se ha reportado que la citocina antiinflamatoria IL-10 está involucrada en el aumento de la deposición de A β y deterioro cognitivo en modelos de ratón transgénico APP que expresan esta interleucina. Se ha informado que los ratones tg APP/PS1 al tener una deficiencia en la producción de IL-10 muestran una reducción de A β en el cerebro, además de tener una fagocitosis microglial mejorada. Esta deficiencia también preserva la integridad sináptica y atenúa la alteración cognitiva en estos animales, los resultados del estudio indican que, en algún momento, IL-10 puede contribuir negativamente en la patología de la EA (Domingues *et al.*, 2017).

Estos resultados son relevantes ya que la información relacionada a la actividad biológica de estos compuestos de tipo cumarina sobre el SNC, incluyendo la neuroinflamación, es escasa. Existen compuestos derivados como el 6-hidroxi-7-isopreniloxicumarina, 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina los cuales se reportan como

insecticidas y larvicidas (Mander, L. y Hung-Wen, L., 2010). Cheriyan *y col.* (2017) reportaron que la herniarina y 7-metoxicumarina (3.5 y 7.0 mg/kg) redujeron la respuesta de espasmo en un modelo murino de dolor. También se ha reportado que herniarina inhibe la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares a través del método de la cámara de Boyden, y reduce la producción neutrofílica de especies reactivas de oxígeno de forma dependiente de la concentración. Se menciona que dicha actividad encontrada en herniarina actúa como un modulador de la respuesta inmunológica innata (Mawa *et al.*, 2016). Herniarina, mostró efecto inhibitor sobre la liberación de eicosanoides de macrófagos aislados del peritoneo de ratón (Silván *et al.*, 1996).

Las actividades biológicas encontradas sobre las variables de las citocinas, con la administración oral de herniarina y 7-isopreniloxicumarina en el modelo de daño inducido con LPS fueron similares. Pero si hubo diferencias significativas entre dichos compuestos al ser administrados tópicamente en el modelo de edema inducido con TPA. Por lo tanto, son necesarios más estudios para establecer el mecanismo de acción preciso a través del cual estas cumarinas ejercen el efecto antineuroinflamatorio.

El uso de fitoterapias ha incrementado considerablemente, a pesar de ser necesarias una mayor cantidad de estudios previos a su aceptación y uso extensivo, se ha demostrado que los fitoquímicos tienen efectos neuroprotectores potenciales en diversos trastornos neurológicos, un ejemplo de ello es la hesperetina, flavonoide encontrado en frutos cítricos con diversas actividades biológicas, entre las que destacan sus efectos anti-inflamatorios, ansiolíticos, neuroprotectores y antidepressivos, por mencionar algunos. (Muhammad *et al.*, 2019), por lo que los resultados encontrados en el presente estudio podrían ser útiles para el desarrollo de tratamientos alternativos para enfermedades neurodegenerativas. Las cumarinas evaluadas produjeron mejores resultados que aquellos observados en el grupo de animales sin daño en cuanto a la reducción de la concentración de IL-1 β e IL-6.

La evidencia acumulada, a través de diversos estudios, sugiere que la microglia reactiva y la astrocitosis juegan un papel importante en la neuroinflamación, y que la activación de estas células gliales, libera a su vez, diversas citocinas inflamatorias, mismas que eventualmente conducen a una neurodegeneración mediada por neuroinflamación. Al mantenerse activos estos procesos inflamatorios, se genera posteriormente un deterioro cognitivo a través de las interacciones mediadas por citocinas entre neuronas y células gliales (Azizi y Mirshafiey, 2012; Muhammad *et al.*, 2019). Debido a los antecedentes acerca del deterioro cognitivo, en el presente estudio se utilizó la prueba de campo abierto para evaluar los cambios en el comportamiento de los ratones administrados con LPS en una prueba de campo abierto. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos entre el grupo basal y grupo Veh, no se observaron cambios significativos en la conducta exploratoria y motora de los ratones administrados con los tratamientos utilizados para llevar a cabo el estudio, a excepción del grupo tratado con el compuesto **1**, en el cual hubo una diferencia significativa en el número de cruces totales realizados por los individuos, estos resultados, en conjunto con las observaciones realizadas, podrían ser indicativos de un efecto sedante del compuesto evaluado.

10. Conclusiones

- Los extractos TIH y TIAC poseen actividad antiinflamatoria, siendo el de menor polaridad (TIH), el más activo.
- La actividad antiinflamatoria de los extractos de mediana (TIAC) y baja polaridad (TIH) se debe a los compuestos de tipo cumarina presentes en ambos.
- La cumarina con mayor actividad antiinflamatoria en el modelo de edema local fue la 7-Isopreniloxicumarina, seguida de la herniarina.
- El extracto TIH, la 7-Isopreniloxicumarina y la herniarina, disminuyen la neuroinflamación y la inflamación sistémica, al disminuir la concentración cerebral y esplénica de citocinas pro-inflamatorias.
- El extracto TIH, la 7-Isopreniloxicumarina y la herniarina, disminuyen la conducta motora espontánea de ratones con neuroinflamación en el ensayo de campo abierto, que indica un efecto sedante.
- Los 5 compuestos aislados (7-isopreniloxicumarina, 7-Metoxicumarina, 7-Isoprenil-6-metoxicumarina, 6,7,8-Trimetoxicumarina y 6,7-Dimetoxicumarina) fueron elucidados estructuralmente y se determinó que 7-isopreniloxicumarina, se reporta por vez primera para *T. lucida* en el presente estudio.

11. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se proponen las siguientes estrategias experimentales que permitan incrementar el conocimiento fitoquímico y farmacológico de *Tagetes lucida*, para el posible desarrollo de alternativas terapéuticas:

- Evaluar el efecto neuroinmunomodulador del extracto hexánico y los compuestos obtenidos para determinar el mecanismo de acción que confiere su actividad antineuroinflamatoria.
- Evaluar la actividad de *Tagetes lucida* sobre la memoria y el aprendizaje, como parámetros de deterioro cognitivo, consecuencia de enfermedades neurodegenerativas.
- Realizar fraccionamiento químico del extracto acetónico para determinar su perfil químico y aislar los compuestos que le confieren su actividad antiinflamatoria.

12. Referencias bibliográficas

1. Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
2. Alzheimer's Disease International. (2015). Dementia statistics. Recuperado de <https://www.alz.co.uk/research/statistics>
3. Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S y Rastrelli, L. (2002). An Extract of *Tagetes lucida* and Its Phenolic Constituents as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 65:1773-1776.
4. Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. y Dwived, N. (2016). Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the Neurological Sciences*, 361:256-271.
5. Azizi, G., y Mirshafiey, A. (2012). The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 34(6), 881–895.
6. Barar, J., Aghanejad, A., Fathi, M. y Omid, Y. (2016). Advanced drug delivery and targeting technologies for the ocular diseases. *BiolImpacts* 6, 49–67.
7. Becher, B., Spath, S., y Goverman, J. (2016). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49–59.
8. Birks, J. y Grimley-Evans, J. (2009). *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database. Syst Rev.* 46:CD003120
9. Bonilla-Jaime, H., Guadarrama-Cruz, G., Alarcon-Aguilar, FJ, Limón-Morales, O. y Vazquez-Palacios, G. (2015). Antidepressant-like activity of *Tagetes lucida* Cav. is mediated by 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *J. Nat. Med.*, 69 (4).
10. Botella, J. y Ferrero, M. (2004) La alimentación del enfermo de Alzheimer en el ámbito familiar. *Nutr. Hosp.*19:(3) 154-159.

11. Bronzuoli, M. R., Iacomino, A., Steardo, L. y Scuderi, C. (2016). Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Inflamm Res.* 9, 199-208.
12. Brown, C. M., Mulcahey, T. A., Filipek, N. C., y Wise, P. M. (2010). Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: Novel roles for estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 151(10), 4916–4925.
13. Cáceres, A., Lange, K., Cruz, S., Velásquez, R., Lima, S., Menéndez, M., Dardón, R., Córdova, D y González, J. (2012). Assessment of Antioxidant Activity of 24 Native Plants Used in Guatemala for Their Potential Application in Natural Product Industry. *Act. Hort.* 85-92.
14. Calderón de Rzedowski, G., Rzedowski, J. (2005). Tagetes. Pp: 921-924. Murillo Martínez, R.M. (Ed.). Flora fanerogámica del Valle de México. (2a Ed., 1a reimp.). Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.
15. Calsolaro, V. y Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers and Dementia.* 12: 719-732.
16. Cardona, L., García, B., Pedro, J.R., Pérez, J. (1992). 6-Prenyloxy-7-Methoxycoumarin, a coumarin-hemiterpene ether from *Caarduus tenuiflorus*. *Phytochemistry* 31(11): 3989-3991.
17. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. (2009). Anti-Helicobacter pylori activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.*122: 402–405.
18. Céspedes, C.L., Avila, J.G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J.C., Salgado-Garciglia, R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem.* 54(10):3521-7.

19. Chandra, V., Pandav, R., Dodge, H.H., Johnston, J.M., Belle, S.H., DeKosky, S.T., Ganguli, M. (2001). Incidence of Alzheimer`s disease in a rural community in India: theIndo-US study. *Neurology*, 57:985-989.
20. Chang CJ, Floss HG, Steck W. (1977). Carbon-13 Magnetic Resonance Spectroscopy of Coumarins. *J Org Chem*. 42:1337-1340
21. Cheriyan, B. V., Kadhivelu, P., Nadipelly, J., Shanmugasundaram, J., Sayeli, V., Subramanian, V., (2017). Anti-nociceptive effect of 7-methoxy coumarin from *Eupatorium triplinerve* Vahl (Asteraceae). *Pharmacogn Mag*. 13, 81-84. doi: 10.4103/0973-1296.197650.
22. Chiu, C.-C., Liao, Y.-E., Yang, L.-Y., Wang, J.-Y., Tweedie, D., Karnati, H. K., Greig, N.-H. y Wang, J.-Y. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 272, 38–49.
23. Cho DY, Ko HM, Kim J, Kim BW, Yun YS, Park JI, Ganesan P, Lee JT, Choi DK. (2016). Scoparone Inhibits LPS-Simulated Inflammatory Response by Suppressing IRF3 and ERK in BV-2 Microglial Cells. *Molecules*. 21(12):1718-1727.
24. Dhanda, S., Sandhir, R., (2018). Blood-brain barrier permeability is exacerbated in experimental model of hepatic encephalopathy via MMP-9 activation and downregulation of tight junction proteins. *Mol. Neurobiol*. 55, 3642–3659.
25. Díaz, A., Guevara, J., Espinosa, B., Chávez, R., Limon, D. (2010) La inflamación como un factor clave para desencadenar la neurodegeneración. *Mensaje bioquímico* 36: 127-137.
26. Domingues, C., da Cruz e Silva, O. A. B., y Henriques, A. G. (2017). Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer`s Disease Neuropathological Hallmarks. *Current Alzheimer Research*, 14(8).
27. Feria-Díaz, G.E., Leyva-Proenza, C.A., Parra, W.C., Castro-Maquilón, A. G. y Larrea-Meza, I.S. (2020). Papel de las citoquinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide. *Correo Científico Médico*. 24(1).

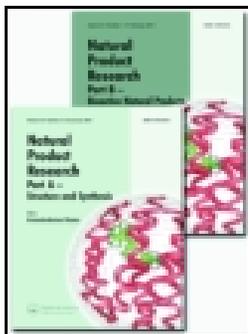
28. Fragoso, J.M., Vargas-Alarcón, G., Jiménez-Morales, S., Reyes-Hernández, O. D. y Ramírez-Bello, J. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*. 150, 334-344.
29. Gábor, M. (2000). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ear oedema (TPA). pp: 28-30. In. Mouse ear inflammation Models and their pharmacological applications. Akadémiai Kiadó. Budapest, Hungría.
30. Gao X Zheng CY, Yang L, Tang XC, Zhang HY. (2009) Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against beta-amyloid peptide. *Free Radic Biol Med*, 46:1454-1462.
31. Guevara, J., Matuz, D. y Vázquez, H. (2012). La inflamación como un factor clave para desencadenar la neurodegeneración. *Mensaje bioquímico*, 36:127-137.
32. Gupta, S., Dhanda, S. y Sandhir, R. (2019). Anatomy and physiology of blood brain barrier. *Brain targeted drug Delivery Systems*: 7-31
33. Joshi, Y., Giannopoulos, P., Chu, J. y Praticò, D. (2014). Modulation of lipopolysaccharide-induced memory insult, γ -secretase, and neuroinflammation in triple transgenic mice by 5-lipoxygenase. *Neurobiology of Aging*, 35:1024-1031.
34. Kandel, E., Schwart, J. y Jessel, T. (2001). Envejecimiento del cerebro y demencia de tipo Alzheimer. *Principios de Neurociencia* (1149-1159). Madrid, España: McGrawHill.
35. Kandel, E., Schwart, J. y Jessel, T. (2001). Neuronas y conducta. (4ª Ed.).
36. Kiguchi, N., Kobayashi, Y. y Kishioka, S. (2012). Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(1), 55–61.
37. Kim, Y.-K., Na, K.-S., Myint, A.-M., y Leonard, B. E. (2016). The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the

- neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 277–284.
38. Mander, L. y Hung-Wen, L. (2010). *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Vol. 1. Elsevier. Langford Lane, United Kingdom.
 39. Martínez-Díaz, J. A., García, L. I., Hernández, M. E., y Aranda-Abreu, G. E. (2015). Efectos sobre la locomoción y la memoria de 2 modelos de hipoperfusión cerebral en ratas Wistar macho. *Neurología*, 30(7), 407–415.
 40. Mawa, S., Jantan, I., Husain, K. (2016). Isolation of terpenoids from the stem of *Ficus aurantiaca* Griff and their effects on reactive oxygen species production and chemotactic activity of neutrophils. *Molecules*. 21, 9. doi:10.3390/molecules21010009.
 41. Mejía-Barajas, J.A., Del Río, R.E.N., Martínez-Muñoz, R.E., Flores-García, A. y Martínez-Pacheco, M.M. (2012). Cytotoxic activity in *Tagetes lucida*. *Emir J Food Agric*. 24:142-147.
 42. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. (2016). *Estrategias en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud*. Madrid, España.
 43. Monterrosas, N. (2013). *Evaluación de especies de Agave sobre los procesos fisiopatológicos asociados al Alzheimer*. Tesis de doctorado, IPN. Yautepec, Morelos.
 44. Monterrosas-Brisson, N., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., Bahena-Pérez, R., Avilés-Flores, M., Fuentes-Mata, M., Martínez-Duncker, I. y González-Cortazar, M., (2019). Anti-inflammatory activity of coumarines isolated from *Tagetes lucida*. *Cav. Nat. Prod. Res.* 8, 1-5.
 45. Mora-Gallegos, A. y Salas-Castillo, S. (2014). Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales. *Actualidades en Psicología*, 28(117): 1-12.

46. Morales, I., Farías, G. y Maccioni, R. (2010). La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiat.*, 48 (1): 49-57.
47. Morris, J., Honea, R., Vidoni, E., Swerdlow, R. y Burns, J. (2014). Is Alzheimer's disease a systemic disease?. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(9): 1340–1349.
48. Muhammad, T., Ikram, M., Ullah, R., Rehman, S., & Kim, M. (2019). Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. *Nutrients*, 11(3), 648.
49. Owen, J., Punt, J., Stranford, S. y Jones, P. (2014). Sistemas y métodos experimentales. (7ª Ed.), *Kuby Inmunología* (660-663) Ciudad de México, México: Mc. Graw Hill Education.
50. Pascual-Garvi, J.M., González-Llanos, F., Prieto-Arribas, R., Cerdán, S. y Roda, J.M. (2004). La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rev. Neurol.*, 38 (6):565- 581.
51. Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Brindis, F., Vibrans, H., y Reyes-Chilpa, R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *J Ethnopharmacol.* 181:221-228.
52. Polanco, L.A., Vargas-Irwin, C. y Góngora, M. E. (2011). Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma psicológica.* 18(2): 141-148.
53. Qin, L., He, J., Hanes, R. N., Pluzarev, O., Hong, J.-S., & Crews, F. T. (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *Journal of Neuroinflammation*, 5(1), 10.

54. Ray, B. y Lahiri, D. (2009). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin. *Current Opinion in Pharmacology*, 9:434-444
55. Rezaee, R., Behravan, E., Behravan, J., Soltani, F., Naderi, Y., Emami, B. y Iranshahi, M. (2013). Antigenotoxic activities of the natural dietary coumarins umbelliferone, herniarin and 7-isopentenyl-oxycoumarin on human lymphocytes exposed to oxidative stress. *Drug Chem Toxicol.* 37(2): 144–148.
56. Robles Bayón, A. (2019). Demencias degenerativas: ¿Un dilema de síndromes o de enfermedades?. *Neurología*.
57. Ruiz, P.B. (2002). Antagonista del receptor de IL-1. *Rev Esp Reumatol*, 29(3): 120-124
58. Sepúlveda-Arias, J., Veloza, L., Escobas, L., Orozco, L. y Lopera, I. (2013). Anti-inflammatory effects of the main constituents and epoxides derived from the essential oils obtained from *Tagetes lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* and *Eucalyptus citriodora*. *Journal of Essential Oil Research*, 25 (3):186-193.
59. Silván, A.M., Abad, M.J., Bermejo, P., Sollhuber, M. y Villar, A.. (1996). Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J Nat Prod.* 59(12):1183-1185.
60. Son, D.J., Lee, G.R., Oh, S., Lee, S.E. y Choi, W.S. (2015). Gastroprotective efficacy and safety evaluation of scoparone derivatives on experimentally induced gastric lesions in rodents. *Nutrients.* 7(3):1945-1964.
61. Tayeb, H., Yang, H., Price, B. y Tarazi, F. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 132: 8-25.
62. Torres, R., Mascayano, C., Núñez, C., Modak, B. y Faini, F. (2013). Coumarins of *Haplopappus multiifolius* and derivative as inhibitors of LOX: evaluation *in-vitro* and docking studies. *J. Chil. Chem. Soc.* 58 (4): 2027-2030.

63. Vargas-Soto, F.A., Céspedes-Acuña, C.L., Aqueveque-Muñoz, P.M. y Alarcón-Enos, J.E. (2017). Toxicity of coumarins synthesized by Pechmann- Duisberg condensation against *Drosophila melanogaster* larvae and antibacterial effects. *Food Chem Toxicol.* 109 (2):1118-1124.
64. Vera, N., Popich, S., Luna, L., Cravero, R., González-Sierra, M. y Bardón, A. (2006). Toxicity and synergism in the feeding deterrence of some coumarins on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem Biodivers.* 3(1): 21-26.
65. Von Bernhardt, R. (2007). La neuroinflamación en la patogénesis de la enfermedad de alzheimer. *Departamento de Neurología*, 32 (1): 4-15.
66. Zakaria, P., Wan Yaacob, W.M.H., Othman, Z., Long, I., Ahmad, A.H., Al- Rahbi, B. (2017). Lypopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's Disease. *Physiol. Res* 66: 553-565.
67. Zhou, Y., Huang, X., Zhao, T., Qiao, M., Zhao, X., Zhao, M., Xu, L., Zhao, Y., Wu, L., Wu, K., Chen, R., Fan, M. y Zhu, L. (2017). Hypoxia augments LPS-induced inflammation and triggers high altitude cerebral edema in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 64, 266–275.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav.

Monterrosas-Brisson Nayeli, Herrera-Ruiz Maribel, Jiménez-Ferrer Enrique, Bahena-Pérez Rafael, Avilés-Flores Margarita, Fuentes-Mata Macrina, Martínez-Duncker Ivan & González-Cortazar Manasés

To cite this article: Monterrosas-Brisson Nayeli, Herrera-Ruiz Maribel, Jiménez-Ferrer Enrique, Bahena-Pérez Rafael, Avilés-Flores Margarita, Fuentes-Mata Macrina, Martínez-Duncker Ivan & González-Cortazar Manasés (2019): Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav., Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2018.1553172](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553172)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553172>

 View supplementary material 

 Published online: 08 Jan 2019.

 Submit your article to this journal 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav.

Monterrosas-Brisson Nayeli^b, Herrera-Ruiz Maribel^a, Jiménez-Ferrer Enrique^a, Bahena-Pérez Rafael^b, Avilés-Flores Margarita^c, Fuentes-Mata Macrina^c, Martínez-Duncker Ivan^d and González-Cortazar Manasés^a 

^aCentro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Morelos, México; ^bFacultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Morelos, México; ^cINAH-Morelos, Morelos, México; ^dCentro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Morelos, México

ABSTRACT

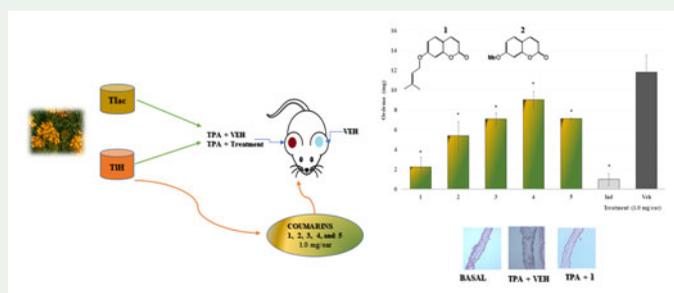
The anti-inflammatory activity of hexane (TIH) and acetone (TIAC) extracts from the aerial parts of *Tagetes lucida* were evaluated in a mice model of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA)-induced auricular oedema. Also, five coumarin compounds from the TIH extract were identified, characterized and evaluated: 7-isoprenyloxy-coumarin (**1**), herniarin (**2**), 6-methoxy-7-isoprenyloxy-coumarin (**3**), 6,7,8-trimethoxycoumarin (**4**) and scoparone (**5**). Compounds **1** and **3** had not been previously identified in *T. lucida*. Compound **1** showed the highest activity with an 81.1% of oedema inhibition, while **2** reduced it in 54.4%, the other compounds showed less than 50% of inhibitory activity. The chemical structure of the compounds reveal that the substituent at the C-7 position is a crucial factor in exerting the anti-inflammatory activity.

ARTICLE HISTORY

Received 11 October 2018
Accepted 25 November 2018

KEYWORDS

Tagetes lucida; coumarins; anti-inflammatory activity; extract; isoprenyl



1. Introduction

The *Tagetes* genus belongs to the *Asteraceae* family and includes approximately 56 species (Ibrahim et al. 2015) of which several have been investigated as possible

CONTACT Herrera-Ruiz Maribel  cibis_herj@yahoo.com.mx; González-Cortazar Manasés  gmanases2000@gmail.com

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553172>.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

sources of different chemical and biochemical compounds of high pharmaceutical and nutritional value. A study of a methanolic extract of flower of *Tagetes erecta* and the root of *Beta bulgaris* against four strains showed bactericidal activity, being *Bacillus subtilis* the most susceptible to all they. Both species also showed antioxidant activity and a high total phenolic content (Saani et al. 2018). On the other hand, from a methanolic extract and its *n*-hexane fraction of *Tagetes minuta*, five compounds were isolated (ecliptal, 5-(4-hydroxybut-1-ynyl)-2,20-bitiophene, 22,23-dihydrospirosterone, stigmasterol and a new fatty acid peroxy (tagetnoic acid), of which, the last three showed a potent inhibitory activity of lipoxygenase (5-LOX) (Ibrahim et al. 2018). Another study performed on this same species (*T. minuta*) of the *n*-hexane fraction, a new thiophene derivative called thiotagetin A was obtained and showed cytotoxic activity against the cancer cell lines KB and MCF7 (Ibrahim and Mohamed 2017).

Plant species *T. lucida* Cav., is a native aromatic plant considered one of the most important in Mexico, due to its frequent use in rituals and ceremonies. Its common names include “pericón”, “yauhtli” (nahuatl), “hierba anis” or “hierba de Santa María”; in English it is called Mexican mint marigold (Guadarrama-Cruz et al. 2008; Duke et al. 2009) and is used for the treatment of nervousness, headaches, stomach pain, and inflammatory disease (Monroy and Castillo 2007). A recent study of *Tagetes lucida* propagated in Egypt from seeds of Canada allowed to know that the main component in the essential oil was methyl chavicol. On the other hand chlorophyll, carotenes and coumarins are increased in their concentration due to the age of the plants, while the opposite was true with flavonoids content. (Omer et al. 2017). Despite its ethnomedical uses for the treatment of inflammatory diseases, there are no pharmacological studies to prove it, so the objective of this work was to evaluate the hexanic (TIH) and acetonetic (TIAc) extract of the aerial parts of *T. lucida* and those of coumarins obtained from of TIH in the model of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA)-induced ear oedema.

2. Results and discussion

Mice treated with TPA, induced the highest oedema weight (11.8 ± 1.7 mg). Tissue thickening with extravasation of fluid was observed. The administration of indomethacin (Ind) a non-steroidal anti-inflammatory drug, significantly reduced the inflammatory effect (1.04 ± 0.7 mg), compared to the TPA group (* $p < 0.05$) with an oedema inhibition of 91.1% (Table 1). The *T. lucida* extracts TIAc and TIH also decreased significantly ear oedema (2.8 ± 0.6 and 0.85 ± 0.26 mg respectively) in comparison with the TPA group (* $p < 0.05$), representing a 75.9 and 92.7% of oedema inhibition, respectively. It should be noted that the effect shown by TIH was similar to Ind (Table 1).

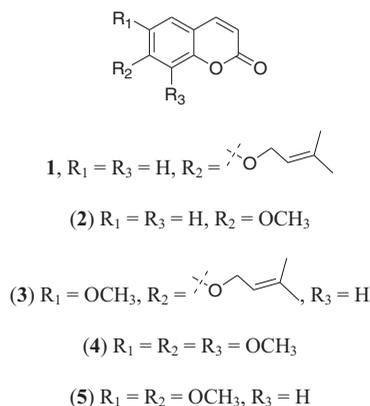
Chromatographic separation of the extract (*n*-hexane) allowed the isolation and identification of five bioactive coumarins (1-5); three of them had already been found in this species (2, 4 and 5) (Mejía-Barajas et al. 2012; Pérez-Ortega et al. 2016) and two (1 and 3) are reported here as new isoprenylated coumarins in *T. lucida* (Figure 1).

Compound 3 was obtained as an amorphous white precipitate. The ^1H NMR spectrum exhibited two singlet aromatic ring signals in δ 6.84 (1H, s) and 6.81 (1H, s) and a double bond in δ 6.24 (1H, d, 9.5 Hz) and 7.6 (1H, d, 9.5 Hz) corresponding to H-5,

Table 1. Effect of treatments from *T. lucida* on auricular oedema-induced by 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA) in ICR mice.

Treatments (1.0 mg/ear)	Oedema (mg)	Oedema Inhibition (%)
Extracts from <i>T. lucida</i>		
TIAc	2.8 ± 0.6	75.9
TIH	0.85 ± 0.26	92.7
Coumarins from <i>T. lucida</i>		
1	2.22 ± 0.9	81.1
2	5.38 ± 1.0	54.4
3	7.06 ± 0.6	40.1
4	9.0 ± 0.8	23.7
5	7.1 ± 0.1	39.8
Controls		
Ind	1.04 ± 0.7	91.1
Veh	11.8 ± 1.7	-----

TIAc: acetonic extract; TIH: *n*-hexanic extract; Ind = Indomethacin; Veh = Vehicle from TPA (acetone). Analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni ($n = 7$; mean ± standard deviation [SD]). * $p < 0.05$ in comparison with the negative control group -Veh-.

**Figure 1.** Structures of the isolated compounds 1-5.

H-8, H-4 and H-3 respectively, of a coumarin skeleton of the benzopyrone type, with two substituents one a methoxyl in δ 3.88 (3H, s) which correlates with the carbon signal in HMBC in δ 146.62, assigned to C-6 and an oxygen base signal and according to the DEPT experiment corresponds to a CH_2^- in δ 4.64 (2H, d, 6.6 Hz, H-1'a and H-1'b) that correlates in HMBC with the signal in δ 152.11 assigned C-7 of the aglycone. The proton signal of H-1' (δ 4.64) showed coupling with a double of double signal in δ 118.53 and that is assigned to a double bond C-2', that correlates in HMBC with three carbon signals: one with two methyl's in δ 25.27 and 18.24 assigned to C4' and C-5' respectively, and another with quaternary in 138.86 assigned a C-3'. So, it was determined that this is an isoprene unit. According to these analyses of 1H and ^{13}C NMR data (see experimental part) and their comparison with the data previously described (Cardona 1992), this compound was identified as 6-methoxy-7-isoprenyloxycoumarin or 7-O-prenyl-scopoletin (**3**). Likewise, compound **1** in the 1H NMR spectrum, exhibited the same signals as **3**, but without the presence of methoxyl group in C-6, this was observed by the ABX spin system in δ 7.29 (1H, d, 8.5 Hz, H-5), 6.74 (1H, dd, 2.3, 8.5 Hz, H-6) and 6.67 (1H, d, 2.3 Hz, H-8)

corresponding to H-5, H-6 and H-8 respectively. According to the analysis of ^1H and ^{13}C NMR data (see experimental part) and its comparison with the previously described data (Chang 1977), this compound was identified as isoprenyloxycoumarin or 7-*O*-prenyl-umbelliferone (**1**). Coumarins **2**, **4** and **5** were compared with those described in the literature (Chang et al. 1977; Osborne 1989) and were identified as 7-methoxycoumarin or herniarin (**2**), dimethylfraxetin or 6,7,8-trimethoxycoumarin (**4**) and scoparone or 6,7-dimethoxycoumarin (**5**), respectively.

The biological activity of the coumarins **1** and **2**, they significantly reduced ($p < 0.05$) the weight of the oedema (**1**, 2.22 ± 0.9 and **2**, $5.38 \pm 1.0\text{mg}$), which meant 81.1 and 54.4% respectively. Compounds **3**, **4** and **5** showed weak inhibition (7.06 ± 0.6 , 9 ± 0.86 and $7.1 \pm 0.1\text{mg}$) (Table 1). It can be observed that administration of TPA caused erythema, oedema and polymorphonuclear leukocyte infiltration within the ear epidermis, primarily present in the mid and higher levels, and there were some areas of focal thinning of the epidermis. Within the upper, mid, and deep dermis, neutrophils were mainly grouped. A marked dermal oedema with dilated vascular, lymphatic spaces and a mild perivascular mononuclear infiltrate of lymphocytes and monocytes that can be appreciated at 40X (Figure 2B). All these characteristics were not observed in the basal group (Figure 2A). The ears that received a dose of 1.0 mg/ear of TIAC, THI or coumarins **1** and **2**, presented a decreased ear thickness, associated to decreased oedema. Furthermore, there was a reduction in cellular infiltrate. The histological analysis of these treatments showed only rare inflammatory cells within the epidermis, but a slight perivascular neutrophilic inflammatory infiltrate was present but with a significantly less oedema (Figure 2D-G, supplementary data). A similar effect was observed on the ears treated with indomethacin, an anti-inflammatory non-steroidal drug (Figure 2C).

The anti-inflammatory effect shown by coumarins in atrial oedema induced by TPA indicates that the basic structure of this type of compounds is particularly related to the replacement of the substituent in position C-7, for example, compounds **1** has isoprenyl and is the most active; when that group is substituted by methoxyl (compound **2**) the activity is lower. On the other hand when the isoprene group at C-7 is present but additionally at position C-8 is methoxyl group (compound **3**) the activity is even lower.

3. Conclusion

The non-polar extract from *Tagetes lucida* possesses clinically relevant anti-inflammatory activity against TPA-induced oedema. This activity was reproduced by 7-isopreniloxycoumarin, a new compound isolated in this species.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

González-Cortazar Manasés  <http://orcid.org/0000-0002-3693-1670>

References

- Cardona L, Garcia B, Pedro JR, Pérez J. 1992. 6-Prenyloxy-7-methoxycoumarin, a coumarin-hemiterpene ether from *Carduus tenuiflorus*. *Phytochem.* 31:3989–3991.
- Chang CJ, Floss HG, Steck W. 1977. Carbon-13 magnetic resonance spectroscopy of coumarins. *J Org Chem.* 42:1337–1340.
- Duke J, Bogenschutz-Godwin M, Ottensen AR. 2009. *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 688–690.
- Guadarrama-Cruz G, Alarcón-Aguilar FJ, Lezama-Velasco R, Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H. 2008. Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *J. Ethnopharmacol.* 120:277–281. Epub 2008/11/20.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA, Abdel-Latif MMM, El-Messery SM, Al Musayeb NM, Shehata IA. 2015. Minutaside a, new α -amylase inhibitor flavonol glucoside from *Tagetes minuta*: antidiabetic, antioxidant, and molecular modeling studies. *Starch.* 67:976–984.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA, Al Haidari RA, El-Kholy AA, Zayed MF, Khayat MT. 2018. Tagetnoic acid, a new lipoxygenase inhibitor peroxy fatty acid from *Tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. *Nat. Prod. Res.* DOI:10.1080/14786419.2018.1488712.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA. 2017. Thiotagetin A, a new cytotoxic thiophene from *Tagetes minuta*. *Nat Prod Res.* 31:543–547.
- Mejía-Barajas JA, Del Río REN, Martínez-Muñoz RE, Flores-García A, Martínez-Pacheco MM. 2012. Cytotoxic activity in *Tagetes lucida*. *Emir J Food Agric.* 24:142–147.
- Monroy C, Castillo P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, p. 265.
- Omer EA, Hendawy SF, Ismail RF, Petretto GL, Rourke JP, Pintore G. 2017. Acclimatization study of *Tagetes lucida* L. in Egypt and the chemical characterization of its essential oils. *Nat Prod Res.* 31:1509–1517.
- Osborne AG. 1989. ^{13}C NMR spectral study of some methoxycoumarin derivatives. A re-assignment for ciropten (limettin) and an examination of *peri*-proximity effects for the methyl-methoxy and methoxy-methyl couples. *Magn Res Chem.* 27: 348–354.
- Pérez-Ortega G, González-Trujano ME, Ángeles-López GE, Brindis F, Vibrans H, Reyes-Chilpa R. 2016. *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *J Ethnopharmacol.* 181:221–228.
- Saani M, Lawrence R, Lawrence K. 2018. Evaluation of pigments from methanolic extract of *Tagetes erecta* and *Beta vulgaris* as antioxidant and antibacterial agent. *Nat Prod Res.* 32: 1208–1211.

Cuernavaca, Morelos a 2 de Diciembre de 2020

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: **RAFAEL BAHENA PÉREZ**, con el título del trabajo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINEUROINFLAMATORIO DE *Tagetes lucida* EN UN MODELO DE DAÑO INDUCIDO CON LIPOPOLISACÁRIDO.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo 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: M. EN C. CAROLINA ABARCA CAMACHO

SECRETARIO: DR. NAHIM SALGADO MEDRANO

DRA. NAYELI MONTERROSAS BRISSON

DR. DANTE AVILÉS MONTES

DR. JESUS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER



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

NAHIM SALGADO MEDRANO | Fecha:2020-12-04 18:12:48 | Firmante

V8iyCAInzyg545S86vM3TGvZM0pv9shspasgaNTlybWTqEcC4EJF0VU71fX8wSn7TSeKoXj7jwC0QzjZla1tE66ux8rhWPa02+v/SYWINeVs8VinOjc7vX9W+71/AuiBgvudOnXeASU
C6pz8Zxro4Pubtf9I7XJMU72wHBq6wKB4eAep1d9d4EvicyFRv0j0eRWG6mnqWyceMIVWUBqbwZxe597k/uFOLIMki2/HmkhF0MHZi/Cml1A5CO/IIXIN/SFEVwwLXAbe7TzTu3cp
cP8Pym70+OL6W9LKzOwyeWgAKooX7QUw3dLnoqX1WHmo7cc117qCm/FGeGP/kh/aRA==

NAYELI MONTERROSAS BRISSON | Fecha:2020-12-04 18:40:24 | Firmante

nOexSn4743CA9kSrhHosL5WByYH4EywcfSjVVDjOPM+eg4zDyF//swl75yeHIFrhBDfHP2g6QOZQx2iXOm1f035BZza2tQD8HloKu4LYoKMjmxWug8eD6gn7xY+9VlqFxxO3xT0
v5M82YqDKctFTWMyMxKrezXB/OmEqPbnxdQlhuX4OY/eKdiy9xBwqeOsF/g9JJD6lvfp3IW/5MdOuQMoHR3gVDKUd0KwCTAf4dx15+jhKZGeQMckj0kCHcL4YjVN1TbZ7xOvT
8bSAPmrHdrewRjibX7ufze+u3nEA3zr8hVtaYmX1e8jkl+qBkv+m4uihVbPExwylhNIE0uA==

DANTE AVILES MONTES | Fecha:2020-12-09 11:21:04 | Firmante

Cvcw/6q+dN8sgj5hGzo+EPeP6nZDzRUzsKmR+fPrTHoZqDsNzOL3rf74XpSXJY2Z53s6q7QcUfxwdDBN3mdd581/nPwLLZzVLwi4nA1M4TuAAf8i6bO6ND1PVZGEMxiNcNG
T/F4bEmdLH4pQzgwVrMw4XpE0Llf4YnSLmxF80K6qOpHzdv2PsOUOsLTiKpFmOTpdii6j5ZbCBBwtR1vYyfXK5MbC/eS/Y7dXojnclEyUfWNmpJwS0hMunfA4XyWDVnVQ7ZG6
A68luevFcmTmsf+jRiuTcQeUUCJawjQnlDrfMvunz3oxypKxhVfVa8U8haliOGs6JdNOcsd0ng==

JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER | Fecha:2020-12-10 09:51:30 | Firmante

Olk3c3+MvyBPdYebL6i+ruHIT/CYxa2XDQdBeffiGpKCOKHcnhtgPwFEgBIDI//7VM1CBIIU2RlUaJfKsU/VIELK1DyfG64Gt/ou/pvdeYod1o+sdsRR+UfSLDNoOeohdkjJnWOC05Zlz
p3axPTuu8SxR571YXkhvjE7dgvQRsdeDmbfdF0ukdemHgh5/ly6uNwAKLYgg9vN1cx6eN3R4V/Mh/Sjh6wghlvCTefO1GDNDGG0oxyU8xtyqaaPFsCgEVTy1xlvSLNdmvQkQ7oUK
qJEWb3oHxxvWYL6CUqyJGaky9C9aWDPso7DKQvMRuugU5aRRizHoyEmfvYOJpDyA==

CAROLINA ABARCA CAMACHO | Fecha:2021-01-13 14:24:41 | Firmante

hsRzmdYcP57b9VXQv87tn9SZpOwAm42XMPC3fyCwAmO0zFK8yvO41Gr1AytXJ6uWMeN+YzBDsHCl9uZSI9NwoAKjccY0RaneijNRnUCe7Xn9V7rnuCSTK5tA0t+br94WN859
l9ytU0Rgr3LWlwZMfqwYF9hRrOYoPtfRZvq5Z4XVaTclQHyyU4TgyJifAUB2/71W4Wz6QRDsgYFUM/aTKzoGQ6rhZGZp3daE2YJ2SSmfVcn6eEurkDqrky68SiB7nuO3la5ZA0qrB
UUzyywZa3RSMfvtkvMeyU738fy8dZ2GkSTF/HQY3vcoNbzakiz3+Dv6u22ER2C8ecYLBuA==

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



CsiwBH

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/E8Gw3sbZJhE7LCZD7pFAMvjy7T1pK2r>

