



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE ESPECIES VEGETALES
UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MAYA**

Tesis que presenta

CRISTINA MARISOL CASTILLO BAUTISTA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

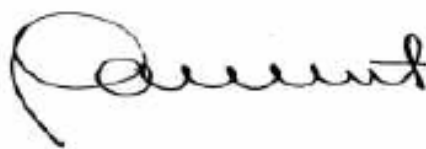
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de CRISTINA MARISOL CASTILLO BAUTISTA titulado "EFECTO NEUROPROTECTOR DE ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MAYA", fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y en el Laboratorio de Nutrición Acuicola del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Mérida, bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Rosa Esther Moo Puc, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de junio de 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: Cristina Marisol Castillo Bautista

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y en el laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Mérida, bajo la dirección de el Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Rosa Esther Moo Puc.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. de beca: 429922) para la realización de la presente tesis.

A mis asesores, el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Rosa E. Moo Puc, por haberme dado las valiosas enseñanzas y consejos en la realización del presente trabajo. Al igual, gracias por su paciencia, su amistad y la confianza depositada en mí.

Al Dr. Iván Velasco Velázquez, por la colaboración y el apoyo para la realización de los ensayos biológicos.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Mérida, por las instalaciones e infraestructura brindadas en la realización de este trabajo.

Al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por las instalaciones prestadas en la realización de los ensayos biológicos durante la estancia de investigación.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, de la Unidad de Biotecnología del CICY, por su apoyo técnico en la realización del trabajo de laboratorio.

Al Dr. Daniel Cortés Pérez del IFC de la UNAM, por su apoyo técnico en la realización de los ensayos biológicos.

Al Téc. Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, por el apoyo de la colecta e identificación de las especies vegetales.

Al H. Comité Revisor de Tesis, integrado por la Dra. Cecilia M. Rodríguez García, Dra. Blondy Canto Canché y Dr. Jairo R. Villanueva Toledo, por sus valiosas observaciones y comentarios hacia este trabajo.

A la red temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa y al CICY, por el apoyo para la realización de la estancia de investigación.

A mis amigos de Laboratorio de Química Productos Naturales del CICY: Lía Valencia, Jimmy Ceballos, Ana Carrillo, Carlos Castañeda, Héctor Peniche y Uriel Figueroa, por todos los momentos y experiencias compartidas durante el posgrado.

A mis amigos del Laboratorio de Neurodesarrollo y Fisiología del IFC: Óscar Carballo, Xóchitl Flores, Rolando Lara y César Menéndez, por haber hecho la estancia de investigación una de las mejores experiencias.

A mis amigos del curso de Comunicación de la ciencia: Pedro Ruiz, Andrés González, Pablo Palma, Gabriela Palomeque, Cristina Pech, Elia Pech, Dinosca Rendón y Julio Salas, por ayudarme en la presentación oral de este trabajo.

A todo el personal administrativo del CICY, en especial a Verónica Gamboa y Alejandra Arceo.

DEDICATORIAS

A mi familia, los amo y gracias por estar siempre para mí.

A mi amado padre Omar Castillo Trejo (q.e.p.d.), quien siempre ha sido una fuente de inspiración y que por él he hecho todo esto. Te dedico en tu memoria el presente trabajo mi querido papirucho.

A todos mis grupos de amigos “NRJL”, “Silvitas”, “Nebes”, “Los buenotes y César”, y a “Amantes del rico postre”.

ÍNDICE

RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	2
ANTECEDENTES	2
ANTECEDENTES	2
1 Enfermedades neurológicas: neurodegenerativas	2
1.1 Mecanismos involucrados en la enfermedades neurodegenerativas	5
1.1.1 Estrés oxidativo	5
1.1.2 Excitotoxicidad	10
1.2 Tratamientos existentes	12
2 Productos naturales	12
2.1 Búsqueda de productos naturales	13
2.2 Etnomedicina: medicina tradicional	14
2.3 Estudios de productos naturales obtenidos de plantas con actividad neuroprotectora	14
HIPÓTESIS	16
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
CAPÍTULO II	20
Tamizaje de plantas utilizadas en la medicina tradicional maya con potencial efecto neuroprotector	20
2.1 INTRODUCCIÓN	20
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.2.1 Selección y obtención del extrato etanólico de las especies vegetales	22
2.2.1.1 Búsqueda bibliográfica	22
2.2.1.2 Material vegetal	22

2.2.1.3 Preparación del extracto	23
2.2.1.4 Preparación de la disolución madre	23
2.2.2 Modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato	23
2.2.2.1 Cultivo celular	23
2.2.2.2 Ensayo citotóxico en las líneas celulares Vero y SH-SY5Y	23
2.2.2.3 Ensayo de neuroprotección contra estrés oxidativo inducido por glutamato	24
2.2.2.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno	25
2.2.2.5 Determinación del potencial de la membrana mitocondrial	25
2.2.3 Modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato	26
2.2.3.1 Animales experimentales	26
2.2.3.2 Aislamiento de neuronas corticales	26
2.2.3.3 Inmunotinción	26
2.2.3.4. Ensayo de citotoxicidad en neuronas corticales	27
2.2.3.5. Ensayo de neuroprotección en neuronas corticales	27
2.2.4 Análisis estadístico	27
2.2.5 Perfil cromatográfico	27
2.3. RESULTADOS	28
2.3.1 Especies vegetales seleccionadas para el estudio	28
2.3.2 Citotoxicidad de los extractos en ambas líneas celulares	32
2.3.3 Neuroprotección de los extractos en el modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato	35
2.3.4 Efecto de los extractos sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y la pérdida de potencial mitocondrial inducida por glutamato	37
2.3.5 Inmunotinciones del cultivo de neuronas corticales	39
2.3.6 Citotoxicidad de los extractos en cultivo de neuronas corticales	40
2.3.7 Efecto neuroprotector de los extractos en cultivo de neuronas corticales contra el daño con glutamato	40
2.3.8 Perfiles cromatográficos de los extractos con efecto neuroprotector	41
2.4 DISCUSIÓN	47
3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	52
3.1 CONCLUSIONES	52

3.2 PERSPECTIVAS	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1	Metabolismo de glutamato.	9
Figura 1.2	Mecanismo de estrés oxidativo inducido por el glutamato a través del sistema cotransporte antiparalelo glutamato-cisteína en neuronas.	10
Figura 1.3	Mecanismo de excitotoxicidad inducido por el glutamato.	11
Figura 1.4	Diferentes fuentes de los fármacos que se encuentran en el mercado de 1984-2014.	13
Figura 1.5	Estrategia experimental para la búsqueda de extractos con efecto neuroprotector.	19
Figura 2.1	Esquema del cultivo primario de neuronas corticales de rata.	21
Figura 2.2	Efecto de los extractos en la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por glutamato a 12.5 μ M por 30 min.	38
Figura 2.3	Efecto de los extractos en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida por glutamato a 12.5 μ M por 30 min.	39
Figura 2.4	Inmunotinción con GFAP, O4 y Tuj1 en cultivo de neurones corticales de 10 DIV.	40
Figura 2.5	Perfiles cromatográficos de los extractos con efecto neuroprotector.	46

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1	Porcentaje total de muertes atribuidas a desórdenes neurológicos en 2005, 2015 y 2030 a nivel mundial.	3
Cuadro 1.2	Incidencia de desórdenes neurológicos en México.	3
Cuadro 1.3	Principales enfermedades neurodegenerativas.	4
Cuadro 1.4	Agentes causantes de estrés oxidativo en el sistema nervioso.	7
Cuadro 2.1	Especies vegetales seleccionadas en este estudio.	29
Cuadro 2.2	Especies vegetales que fueron descartadas en este estudio debido a la dificultad de localizarlas geográficamente.	31
Cuadro 2.3	Especies vegetales que fueron descartadas en este estudio.	32
Cuadro 2.4	Actividad citotóxica de los extractos de las especies vegetales.	33
Cuadro 2.5	Especies vegetales reportadas con efecto neuroprotector.	36
Cuadro 2.6	Concentración efectiva media de los extractos neuroprotectores en el modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato.	37
Cuadro 2.7	Concentración efectiva media (CE ₅₀) de los extractos neuroprotectores en el modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato.	41
Cuadro 2.8	Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de partes aéreas de <i>E. imbricata</i> .	42
Cuadro 2.9	Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de raíces de <i>I. longiflora</i> .	42
Cuadro 2.10	Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de tallos de <i>M. bahamensis</i> .	43
Cuadro 2.11	Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de partes aéreas de <i>S. americana</i> .	44
Cuadro 2.12	Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de raíces de <i>S. americana</i> .	44
Cuadro 2.13	Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de tallos de <i>Z. caribaeum</i> .	45

ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPAR	Receptor de α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosina trifosfato
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CM-H2DCFDA	Cloro metil 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
CySS	Cotransporte anti paralelo de cisteína/glutamato
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DN	Desórdenes neurológicos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIPA	Partes aéreas de <i>Elytraria imbricata</i>
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLU	Ácido glutámico
ILR	Raíces de <i>Isotoma longiflora</i>
MBT	Tallos de <i>Mimosa bahamensis</i>
MK-801	Dizocilpina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
OMS	Organización mundial de la salud
O4	Oligodendrocitos inmaduros
PBS	Búffer de fosfatos
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
Rho123	Rodamina 123
SAPA	Partes aéreas de <i>Schwenckia americana</i>
SAR	Raíces de <i>Schwenckia americana</i>
SOD	Superóxido dismutasa
Tuj1	β -Tubulina clase III
ZCT	Tallos de <i>Zanthoxylum caribaeum</i>

RESUMEN

Las enfermedades neurológicas, como las cerebrovasculares y las neurodegenerativas, son un problema de salud pública a nivel mundial. Se caracterizan por el daño y pérdida de neuronas, causando limitaciones en actividades como caminar, hablar, memorizar y, en el peor pronóstico, la muerte. Los medicamentos que se encuentran actualmente en el mercado no tratan la causa de la enfermedad, por lo que el daño neuronal continúa y la enfermedad sigue progresando. La medicina tradicional maya es conocida por tener una vasta información de especies vegetales usadas en el tratamiento de diferentes afecciones, incluyendo las neurológicas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es investigar el potencial de las plantas utilizadas en la medicina tradicional maya como fuente de metabolitos que tengan el efecto de proteger, recuperar y/o regenerar la estructura y función de las neuronas.

Cincuenta y una especies vegetales fueron encontradas en la literatura que tratan síntomas sugerentes a enfermedades neurológicas, de las cuales 34 se seleccionaron para evaluar su efecto neuroprotector. Extractos etanólicos de estas especies fueron preparados y evaluados en dos modelos de daño inducido por glutamato, uno en la línea celular de neuroblastoma humana (SH-SY5Y) y el otro en cultivo primario de neuronas corticales de rata. De igual manera, se realizaron perfiles cromatográficos de los extractos activos en cromatografía de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés).

De las 34 especies estudiadas se obtuvieron 65 extractos, de los cuales, seis extractos de cinco especies vegetales mostraron efecto neuroprotector en las células SH-SY5Y, siendo el más activo el extracto de raíz de *Schwenckia americana* ($CE_{50} = 11.3 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$), y tres de los seis extractos mostraron efecto en las neuronas corticales de rata, siendo el más activo el extracto de partes aéreas de *Elytraria imbricata* ($CE_{50} = 6.8 \pm 3.1 \mu\text{g/mL}$).

De lo anterior, se observa que la medicina tradicional maya es una fuente de especies vegetales de las cuales se pueden preparar extractos y/o aislar compuestos con efecto neuroprotector. Los extractos etanólicos que resultaron activos serán considerados para futuros estudios.

ABSTRACT

Neurological diseases such as cerebrovascular and neurodegenerative diseases have been a worldwide public health problem. At present, treatments are not dealing with the cause of the condition; thus, the neuronal damage and the disease continue to progress. Mayan traditional medicine is well known to possess vast information on plant species to treat different illnesses, including neurological diseases. The aim of this study was to investigate the potential of the plants used in Mayan traditional medicine in relation to neuronal death and some neurological diseases evaluating their neuroprotective effect *in vitro*.

The plant ethanolic extracts were prepared and tested on two neuroprotective models of damage induced by glutamate: one on human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y), and the second on rat cortical neurons. HPLC chromatographic profiles from active extracts were also obtained.

Fifty one plant species were found in the literature to be utilized for the treatment of symptoms suggestive of neurological disorders, from among which 34 were selected to evaluate the neuroprotective effect. Six extracts from five plant species showed neuroprotective effect on SH-SY5Y cells, being the most active the extract of *Schwenckia americana* roots ($EC_{50} = 11.3 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$); and three extracts exhibited neuroprotective effect on rat neuron cortical model, being the most active the extract of *Elytraria imbricata* aerial parts ($EC_{50} = 6.8 \pm 3.1 \mu\text{g/mL}$).

Plant species employed in Mayan traditional medicine are a great source for preparing extracts and finding compounds to prevent neurodegeneration relevant for the treatment of neurological diseases. From 34 plant species included in this study, five species showed a neuroprotective effect. Thus, their active ethanolic extracts are a great resource to perform future extensive studies leading to the isolation of their active constituents.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurológicas han sido un problema de salud a nivel mundial, dentro de éstas se encuentran las enfermedades cerebrovasculares como la isquemia y la demencia cerebrovascular; trastornos causados por lesiones como trauma y epilepsia; y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple (Chin y Vora, 2014). Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una muerte selectiva y progresiva de neuronas, causando la pérdida de funciones motoras y/o cognitivas en las personas que lo padecen (Guo *et al.*, 2013).

Los tratamientos que se encuentran disponibles en la actualidad son de tipo paliativo, es decir, sólo tratan de aminorar los síntomas, sin embargo, la muerte neuronal continúa por lo que la enfermedad sigue progresando (Hung y Schwarzschild, 2007).

Ante esta problemática, es necesario la búsqueda de agentes neuroprotectores, es decir, agentes que tengan el efecto de proteger, recuperar y/o regenerar la estructura y función de las neuronas (Vajda, 2002).

Una fuente para la obtención de nuevos agentes son la de los productos naturales, en caso particular, los que provienen de las especies vegetales (Newman y Cragg, 2016).

Existen estudios donde reportan la actividad neuroprotectora de extractos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Un ejemplo es el trabajo de Currais *et al.* (2014), en el cual se evaluaron cinco plantas utilizadas en la medicina tradicional de Portugal para tratar desórdenes mentales: *Voacanga africana*, *Tarenna nitiduloides*, *Sacosperma paniculatum*, *Psychotria principensis* y *Psychotria subobliqua*. Éstas se evaluaron en cinco modelos de neuroprotección *in vitro*.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar un tamizaje para la identificación de extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional maya para tratar sintomatología que sugiera alguna enfermedad neurológica y evaluar su efecto neuroprotector.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1 Enfermedades neurológicas: Neurodegenerativas

Las enfermedades neurológicas son un grupo de padecimientos en el que se compromete tanto el sistema nervioso central (cerebro y espina dorsal), como el periférico (nervios periféricos), resultando en el deterioro de diferentes funciones como el habla, la memoria, el balance corporal, movilidad, respiración y función cardíaca.

Estas enfermedades son un problema a nivel mundial tanto de salud como socioeconómico. Se ha estimado que 6.8 millones de personas mueren anualmente debido a estas enfermedades y se ha proyectado que el porcentaje de mortalidad se incrementará, como se observa en el Cuadro 1.1 (OMS, 2006). Este incremento se debe a que este grupo de enfermedades se encuentran asociadas con el envejecimiento, de acuerdo a los reportes de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en 2015, el número de personas mayores a 60 años a nivel mundial se proyecta a más del doble dentro de 35 años, alcanzando aproximadamente 2.1 billones de personas. Por lo menos el 80% de los costos de cuidados médicos es enfocado a personas mayores de 45 años, por lo que la sociedad se encontrará con un reto a nivel socioeconómico en los próximos años (OMS, 2016).

En México, el número de defunciones causadas por trastornos mentales y enfermedades del sistema nervioso en 2011 fue de 13,331 personas (SALUD, 2015) y la incidencia de desórdenes neurológicos (Cuadro 1.2) fue de 10.81 por cada 100,000 habitantes (SALUD, 2014).

Las enfermedades neurológicas pueden dividirse en tres grupos:

- Las de tipo cerebrovascular: isquemia, demencia cerebrovascular, accidentes cerebrovasculares.
- Los trastornos causados por lesiones: trauma y epilepsia.

- Las neurodegenerativas: la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple y enfermedad de Huntington.

Respecto a las enfermedades neurodegenerativas, éstas son un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizado por la pérdida progresiva y selectiva de manera anatómica y/o funcional de células del sistema nervioso; algunas de estas enfermedades se muestran en el Cuadro 1.3 (Guo *et al.*, 2013).

Cuadro 1.1 Porcentaje total de muertes atribuidas a desórdenes neurológicos en 2005, 2015 y 2030 a nivel mundial.

Categoría	2005	2015	2030
Epilepsia	0.22	0.21	0.19
Alzheimer y otras demencias	0.73	0.81	0.92
Parkinson	0.18	0.20	0.23
Esclerosis múltiple	0.03	0.03	0.02
Enfermedades cerebrovasculares	9.90	10.19	10.63
Otras	0.35	0.23	0.13
Total	11.41	11.67	12.02

Cuadro 1.2 Incidencia de desórdenes neurológicos en México.

Categoría	Incidencia (por cada 100,000 habitantes)
Epilepsia	0.22
Alzheimer y otras demencias	7.69
Parkinson	6.74
Enfermedades cerebrovasculares	34.67
Total	10.81

Cuadro 1.3 Principales enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedad	Patología	Células afectadas	Síntomas	Referencias
Alzheimer	Formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares	Reducción de la actividad citocromo oxidasa Desbalance de la homeostasis de calcio. Inducción de muerte en neuronas colinérgicas	Pérdida de memoria, depresión, confusión y agitación	Hameed y Robin-Hsiung, 2011
Parkinson	Agregados de α sinucleína	Disfunción mitocondrial de generación de EROs y muerte de las neuronas dopaminérgicas	Pérdida de equilibrio y la marcha, rigidez muscular, parpadeo lento y dificultad para deglutir	Blandini <i>et al.</i> , 2000 Greenamyre y Hastings, 2004 Hameed y Robin-Hsiung, 2011
ELA	EROs generados por las mutaciones SOD1	Pérdida del potencial de membrana mitocondrial y muerte celular en neuronas motoras	Contracciones, rigidez y debilidad muscular en extremidades superiores e inferiores, pérdida del habla; o dificultad para masticar o deglutir.	Hameed y Robin-Hsiung., 2011
Esclerosis múltiple	Las células T del sistema inmune responden contra los antígenos de mielina	Proceso inflamatorio, desmielinización, daño y pérdida axonal en células motoras.	Pérdida de equilibrio, espasmos musculares y parálisis	McFarland y Martin, 2007 Compston y Coles, 2008
Huntington	Acumulación de huntingtina	Disfunción del complejo II mitocondrial, reducción de ATP	Pérdida de habilidad motora, cambios de personalidad y depresión	Ayala-Peña, 2013 Johri <i>et al.</i> , 2013

1.2 Mecanismos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas

A pesar de que no existe una etiología bien definida, en las enfermedades neurodegenerativas se han encontrado varios mecanismos involucrados en la muerte neuronal descontrolada, éstos son el estrés oxidativo, las alteraciones en las concentraciones de calcio intra- y extra-celular, el mal plegamiento de ciertas proteínas y, en algunos casos, la vulnerabilidad a una estimulación excitatoria excesiva de las neuronas que es conocido como excitotoxicidad (Tovar-y-Romo *et al.*, 2009).

En este trabajo se abordarán dos de estos mecanismos, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad ya que han sido los más estudiados y que se utilizan como blanco para la búsqueda de agentes neuroprotectores.

1.1.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es inducido por el desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), radical hidroperóxido ($HO_2^{\cdot}$) y radicales peróxido ($ROO^{\cdot}$), que son generados constantemente por la cadena respiratoria mitocondrial, y la destoxificación por enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, así como también con antioxidantes de bajo peso molecular como agentes quelantes, glutatión y NADPH mitocondrial (Lin y Flint Beal, 2006; Sayre *et al.*, 2008).

La acumulación de EROs y el decremento de la capacidad antioxidante causa la oxidación de los lípidos celulares (peroxidación lipídica), proteínas y ácidos nucleicos, afectando funciones mitocondriales y rutas de señalización redox lo cual provoca el daño y muerte celular (Hartman *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2014).

Las neuronas son altamente vulnerables a la elevación de EROs y al decremento de los niveles de adenosina trifosfato (ATP), debido a que estas células poseen un alto contenido de lípidos, así como un alto contenido de mitocondrias y alta demanda de energía y oxígeno (Abramov *et al.*, 2007; Adibhatlaand *et al.*, 2010; Sayre *et al.*, 2008).

Otro proceso que se encuentra íntimamente involucrado en la neurodegeneración es la inflamación. El estrés oxidativo puede desencadenar y activar respuestas inflamatorias, causando la activación de las microglías, que son las células mediadoras de este proceso, produciendo EROs como mecanismo de defensa (Rock *et al.*, 2004; Barreto *et al.*, 2014).

Los agentes que han sido descritos como inductores del estrés oxidativo en las neuronas se clasifican como exógenos y endógenos, algunos han sido utilizados en modelos de estudio (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Agentes causantes de estrés oxidativo en el sistema nervioso.

Agente	Mecanismo	Referencia
Metales pesados ^a	Actúan como pro-oxidantes, causando la generación de EROs. Unión a proteínas y ADN causando vulnerabilidad a las neuronas.	Farina <i>et al.</i> , 2013
Toxinas ^a	El metabolito oxidado interactúa con el complejo I de la respiración mitocondrial, causando la pérdida de energía y la generación de EROs.	Kopin y Markey, 1988 Calon <i>et al.</i> , 2001
Pesticidas ^a	Forma un complejo en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, resultando en una producción limitada de adenosina trifosfato y generación de EROs.	Testa <i>et al.</i> , 2005
Neurotransmisores ^b	Estimula la pérdida de potencial mitocondrial, activación de caspasas y producción de EROs.	Murphy <i>et al.</i> , 1989
Péptidos ^b	La acumulación de éstos estimula la formación de EROs y la peroxidación lipídica.	Behl <i>et al.</i> , 1994 Matsuoka <i>et al.</i> , 2001

^a Exógeno^b Endógeno

Como puede observarse en el Cuadro 1.4, el glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios causantes de las enfermedades neurodegenerativas y está involucrado tanto en el estrés oxidativo y la excitotoxicidad, por lo tanto, este fue el agente inductor utilizado en este trabajo.

El glutamato es una molécula mensajera (neurotransmisor) liberada cuando las células nerviosas transmiten señales entre ellas o a un órgano blanco (Zhou y Danbolt, 2016). Es sintetizada de *ново* a partir de la glutamina por la enzima glutaminasa que se encuentra en las neuronas presinápticas. El glutamato se encuentra almacenado en vesículas (vGluT); durante la estimulación nerviosa las vesículas son liberadas y entran en contacto con los receptores ionotrópicos de glutamato, que son los receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDAR) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), y metabotrópicos (mGLUR1-5) de las neuronas postsinápticas. Una vez terminada la sinapsis, el glutamato se interioriza en las células gliales a través de los transportadores de glutamato EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT1); dentro de las células gliales se sintetiza glutamina a partir del glutamato a través de la glutamina sintasa (Figura 1.1) (Hertz *et al.*, 1999; Popoli *et al.*, 2012).

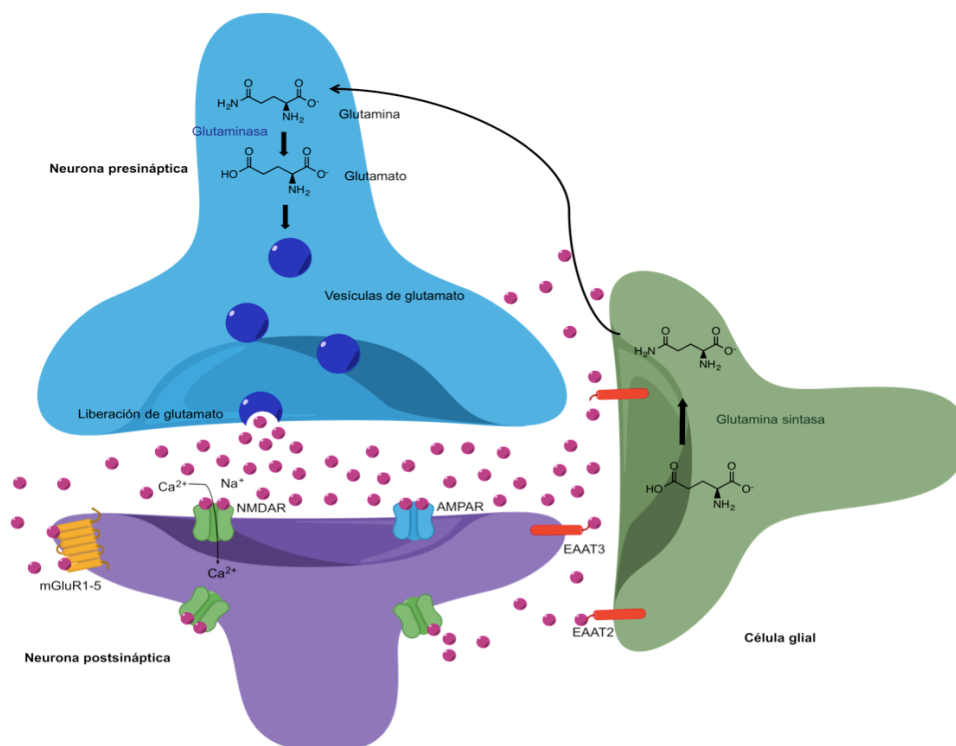
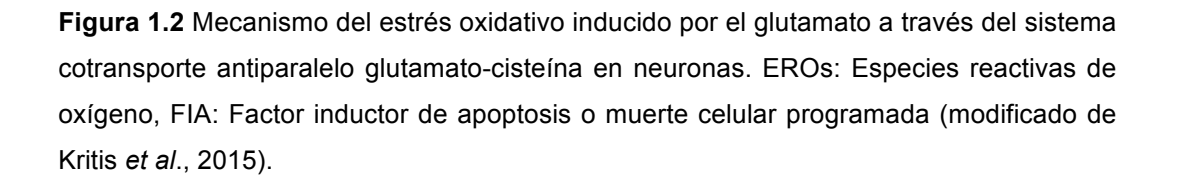


Figura 1.1 Metabolismo del glutamato (modificado de Popoli *et al.*, 2012).

En condiciones normales, el glutamato se encuentra intracelularmente a una concentración en rangos de milimolar, mientras que extracelularmente se encuentra a nivel micromolar. Cuando está en altas concentraciones en el espacio extracelular (a nivel micromolar) provoca toxicidad en las neuronas. Este aumento causa el fallo de la homeostasis de calcio en la neurona, provocando la generación de EROs y desencadenando el estrés oxidativo y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en las neuronas (Lewerenz y Maher, 2015).

El mecanismo responsable del estrés oxidativo es a través del sistema de cotransporte antiparalelo de cisteína-glutamato (CySS). Este sistema permite el paso de dos sustancias en sentido contrario a través de las membranas, en este caso el glutamato y la cisteína a través de un intercambiador de cisteína-glutamato (xCT). En condiciones patológicas, el aumento de la concentración extracelular de glutamato activa el sistema contrasporte, causando el aumento intracelular del glutamato mientras la cisteína intracelular disminuye. La cisteína es un aminoácido precursor del glutatión, un agente antioxidante, por lo que la disminución de la cisteína intracelular produce la disminución de glutatión, provocando la elevación de los niveles de EROs. Las EROs causan daño a organelos como por ejemplo la mitocondria y retículo endoplasmático, dando paso a la generación de mayor cantidad de EROs y a la liberación de factores que dañan el ADN, provocando la muerte neuronal, como se ejemplifica en la Figura 1.2 (Kritis *et al.*, 2015). Se ha observado que este mecanismo se encuentra involucrado en enfermedades neurológicas como la enfermedad de Huntington, Parkinson, Alzheimer, ELA e isquemia (Lin y Flint Beal, 2006; Sayre *et al.*, 2008).



endonucleasas, que son las que se encargan de degradar proteínas, lípidos de la membrana y ácidos nucleicos (Berliocchi *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2009).

La excitotoxicidad se ha relacionado con enfermedades neurológicas, como la isquemia (Guo *et al.*, 2015), Parkinson (Helton *et al.*, 2008), Alzheimer (Parameshwaran *et al.*, 2008) y enfermedad de Huntington (Zeron *et al.*, 2001).

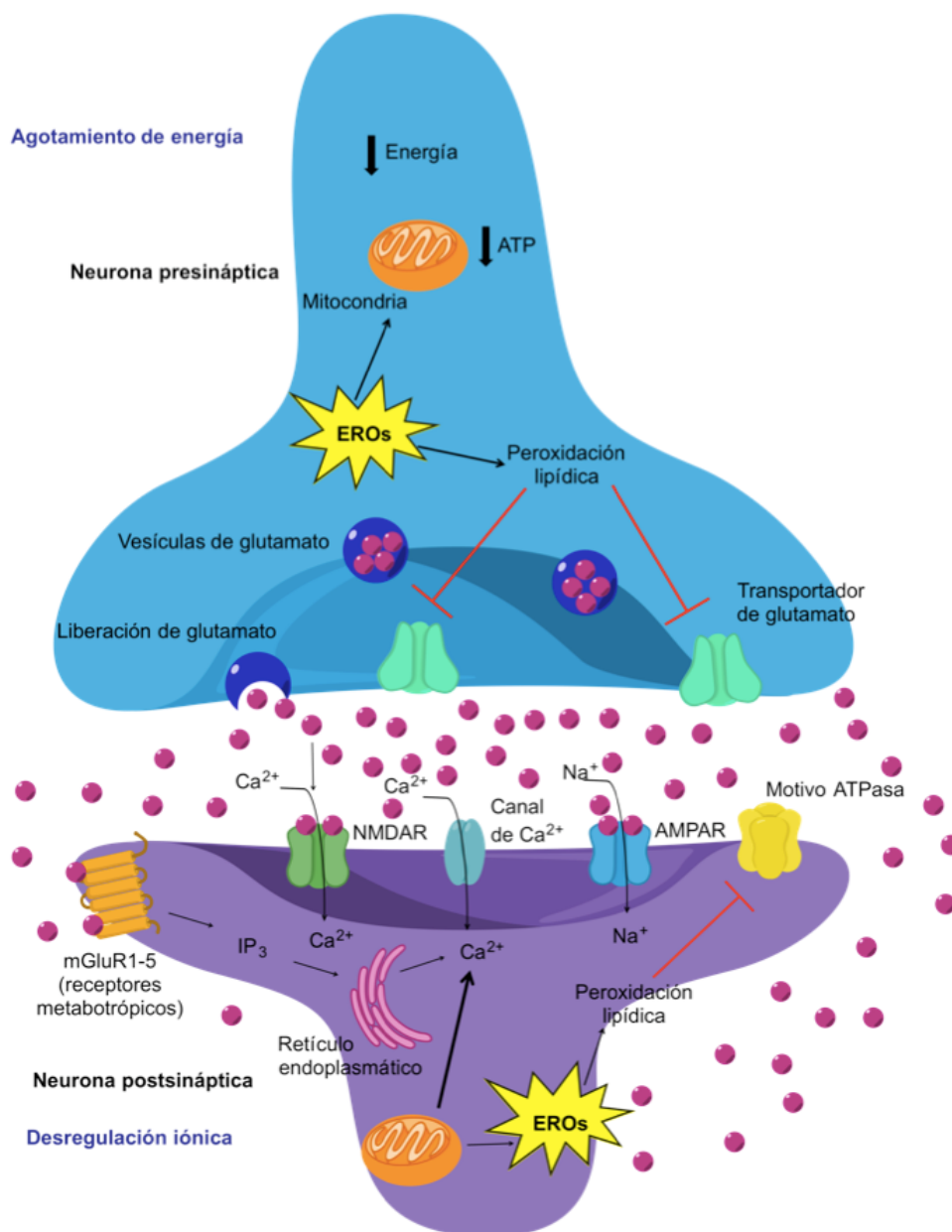


Figura 1.3 Mecanismo de la excitotoxicidad inducido por el glutamato (modificado de Mattson y Magnus, 2006).

1.2 Tratamientos existentes

En la actualidad, los tratamientos están basados en el soporte de la neurotransmisión. A los pacientes con enfermedad de Alzheimer se les suministra estimuladores de la liberación de la acetilcolina e inhibidores de la acetilcolinesterasa como el donepezilo, rivastigmina y galantamina (Yiannopoulou y Papageorgiou, 2013). A las personas que padecen la enfermedad de Parkinson se les suministra agonistas de receptores de dopamina como la levodopa (L-DOPA), que es un precursor de la dopamina, junto con un inhibidor de la DOPA descarboxilasa e inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (Ahlskog, 2007). En el caso de los pacientes con ELA se utiliza el riluzol, éste reduce el daño generado por el glutamato a las neuronas motoras, no obstante, la esperanza de vida sólo aumenta aproximadamente tres meses (Cheah *et al.*, 2010). Estos tratamientos proporcionan beneficios de manera sintomatológica, sin embargo, no modifican el curso o la progresión de la neurodegeneración (Hung y Schwarzschild, 2007).

Por lo anterior, es necesario encontrar agentes neuroprotectores, es decir, agentes que tengan el efecto de salvamento, recuperación y/o regeneración, tanto estructural como funcional de las células del sistema nervioso (Vajda, 2002), evitando así la progresión de la neurodegeneración. Una fuente potencial para la obtención de agentes con dicho efecto es la de los productos naturales.

2 Productos naturales

Los productos naturales son aquellos que derivan de un ser vivo y posee aplicabilidad para el ser humano; se ha establecido que más del 70% de los fármacos provienen de productos naturales o su síntesis está basada en éstos (Figura 1.4). Las especies vegetales son una fuente de productos naturales debido a que contienen una amplia variedad de compuestos que utilizan para sus mecanismos de defensa, reproducción y maduración, a los cuales también se les conoce como metabolitos secundarios. Entre los metabolitos secundarios se encuentran los policétidos, polifenoles, terpenos, alcaloides, entre otros (Harvey, 2008; Newman y Craigg, 2016).

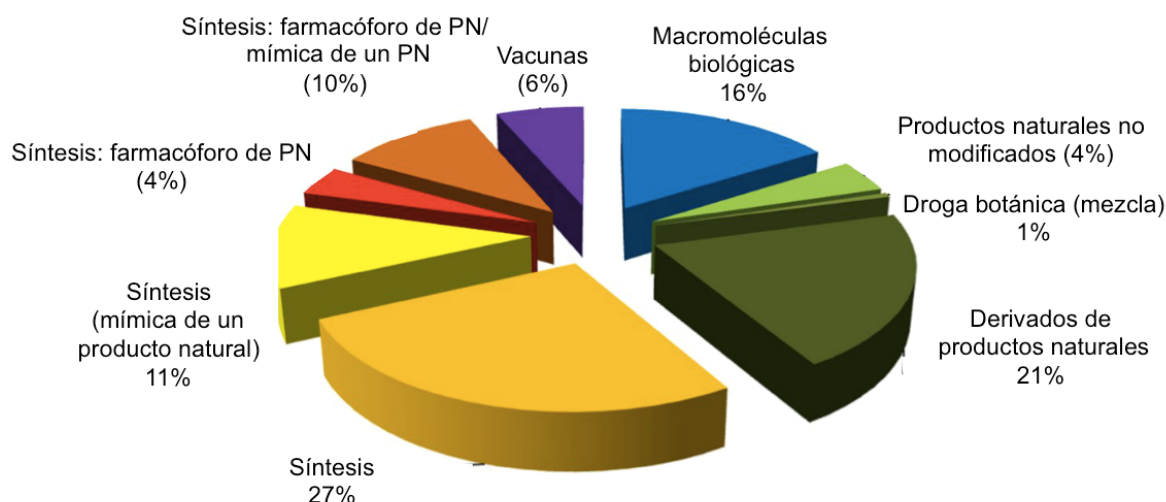


Figura 1.4 Diferentes fuentes de los fármacos que se encuentran en el mercado de 1984-2014 (Newman y Cragg, 2016).

2.1 Búsqueda de productos naturales

Para la búsqueda de productos naturales, en especial de origen vegetal, se puede seguir uno de los tres criterios de selección de las especies vegetales para las evaluaciones biológicas correspondientes.

1) Selección de tipo aleatoria: como su nombre lo dice, se toma de manera aleatoria especies para someterlas a evaluaciones biológicas (Barbosa *et al.*, 2012; Henrich y Beutler, 2013).

2) Selección por estudios de quimiotaxonomía: utiliza datos de estudios quimiosistemáticos y filogenéticos para la selección de especies de cierto género o familia que producen cierta clase de compuestos asociados con actividad biológica o potencial terapéutico (Barbosa *et al.*, 2012)

3) Selección por reportes en la etnomedicina: se basa en la selección de especies usadas en la medicina tradicional de ciertas culturas. Esta ha sido la más utilizada debido a que se ha encontrado mayor cantidad de metabolitos activos. (Fabricant y Farnsworth, 2001; Patwardhan y Marhelkar, 2009; Newman y Cragg, 2016).

2.2 Etnomedicina: Medicina tradicional

La medicina tradicional se define como una práctica que consiste en la suma total de los conocimientos basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (OMS, 2000).

En Yucatán existe bibliografía etnobotánica maya (Osadao, 1834; Arellano-Rodriguez *et al.*, 2003). La medicina tradicional maya presenta un gran listado de especies vegetales de uso medicinal y ha sido utilizado por varios grupos de investigación para encontrar extractos y compuestos con actividad biológica, como por ejemplo, actividad anticancerígena (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011), antimicrobiana (Rosado-Vallado *et al.*, 2000) entre otras. Sin embargo, no se han realizado estudios utilizando la información registrada en la medicina tradicional maya para la búsqueda de agentes neuroprotectores.

2.3 Estudios de productos naturales obtenidos de plantas con actividad neuroprotectora

Existen reportes de identificación de extractos y compuestos obtenidos de plantas medicinales con potencial efecto neuroprotector. Currais *et al.* (2014) estudiaron cinco plantas medicinales de la región de *S. Tomé e Príncipe* (Portugal): *Voacanga africana*, *Tarenna nitiduloides*, *Sacosperma paniculatum*, *Psychotria principensis* y *Psychotria subobliqua*, que son utilizadas para tratar desórdenes mentales, al igual con propiedades analgésica y antiinflamatoria. Los extractos hidroalcohólicos fueron probados en modelos de toxicidad con glutamato (oxitosis), isquemia, toxicidad amiloide intracelular e inhibición de la inflamación. Posteriormente, se realizó el aislamiento de los compuestos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) y a partir del extracto de la corteza de *V. africana* aislaron la vocamina, un alcaloide que mostró una CE₅₀ menor a 3.5 µM en los ensayos antes mencionados.

En otro estudio, 3,6'-disinapoil sacarosa, un oligosacárido aislado de las raíces de *Polygala tenuifolia*, protegió a las células de neuroblastoma (SH-SY5Y) del daño oxidativo inducido por glutamato e inhibió la producción de EROs (Hu *et al.*, 2011). El kaempferol 3-O-β-D-(2"-O-acetil-6"-(E)-p-cumaril)-glucopiranósido, aislado de *Agrimonia eupatoria* (Lee

et al., 2010), la cudarflavona B, aislada de la corteza de *Cudrania tricuspidata*, una planta utilizada en la medicina tradicional china para el tratamiento de contusiones (Lee *et al.*, 2014), y el obovatol y el honokiol, aislados de la corteza de *Magnolia officinalis* (Yang *et al.*, 2013), presentaron efecto neuroprotector en el modelo de daño oxidativo inducido por glutamato en células de hipocampo de ratón (HT22).

HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes a enfermedades neurológicas tienen un efecto neuroprotector.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurológicas como las cerebrovasculares, neurodegenerativas y las causadas por lesiones, son un gran problema de salud a nivel mundial y se han estado incrementando en el transcurso de los años. Éstas afectan al sistema nervioso, causando limitaciones de tipo intelectual y/o motora, disminuyendo la calidad de vida o en el peor pronóstico, la muerte.

Los tratamientos que se encuentran en el mercado en la actualidad son de tipo paliativo y no son eficaces debido a que no evitan la progresión de la enfermedad y sólo aumentan la esperanza de vida por corto tiempo, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con un efecto neuroprotector, siendo una fuente para su obtención la de los productos naturales derivados de plantas.

La medicina tradicional es una fuente de información para la búsqueda de especies vegetales con potencial actividad biológica. En la península de Yucatán se conservan los conocimientos del uso de especies vegetales en la medicina tradicional maya y hasta el momento no existen reportes de estudios utilizando esta fuente de información para la obtención de extractos de especies vegetales con efecto neuroprotector.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se propone realizar un tamizaje para la identificación de extractos que presenten un efecto neuroprotector basándose en el conocimiento que se tiene del uso de especies vegetales en la medicina tradicional maya, para que en un futuro se puedan obtener nuevos agentes terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto neuroprotector de los extractos etanólicos de las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya para las enfermedades neurológicas con base en estudios reportados en la literatura.
2. Preparar extractos etanólicos del material vegetal colectado de las especies seleccionadas.
3. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos etanólicos sobre la línea celular normal de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Vero).
4. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos etanólicos sobre la línea celular de neuroblastoma humana (SH-SY5Y).
5. Evaluar el efecto neuroprotector de los extractos etanólicos sobre la línea celular SH-SY5Y en el modelo de daño inducido con ácido glutámico.
6. Evaluar el efecto de los extractos neuroprotectores sobre la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por ácido glutámico en la línea celular SH-SY5Y.
7. Evaluar el efecto de los extractos neuroprotectores sobre la alteración del potencial de la membrana mitocondrial inducida por ácido glutámico en la línea celular SH-SY5Y.
8. Evaluar el efecto neuroprotector de los extractos etanólicos sobre neuronas corticales rata en el modelo de daño con ácido glutámico.
9. Obtener los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos con efecto neuroprotector a través de cromatografía de alta eficiencia.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental del presente trabajo (Figura 1.5) da inicio con la búsqueda bibliográfica de las especies vegetales utilizadas para tratar este grupo de enfermedades. Posteriormente, la obtención de los extractos por medio de una maceración de la materia vegetal seca con etanol (EtOH). En este estudio se evaluó la citotoxicidad de los extractos etanólicos en la línea normal de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Vero, ATCC® CCL-81™) y en la línea celular humana de neuroblastoma humana (SH-SY5Y, ATCC® CRL-2266™). Los extractos que presentaron una concentración citotóxica media (CC₅₀) mayor a 125 µg/mL, se sometieron a un bioensayo *in vitro* para evaluar el efecto neuroprotector en el modelo de estrés oxidativo inducido por el ácido glutámico en la línea celular SH-SY5Y. Los extractos que resultaron con efecto neuroprotector en el modelo de estrés oxidativo se sometieron a evaluaciones de neuroprotección contra la excitotoxicidad inducido por ácido glutámico en cultivo primario de neuronas corticales de embriones de rata (*Rattus norvegicus*). Por último, se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los extractos que presenten actividad neuroprotectora a través de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés).

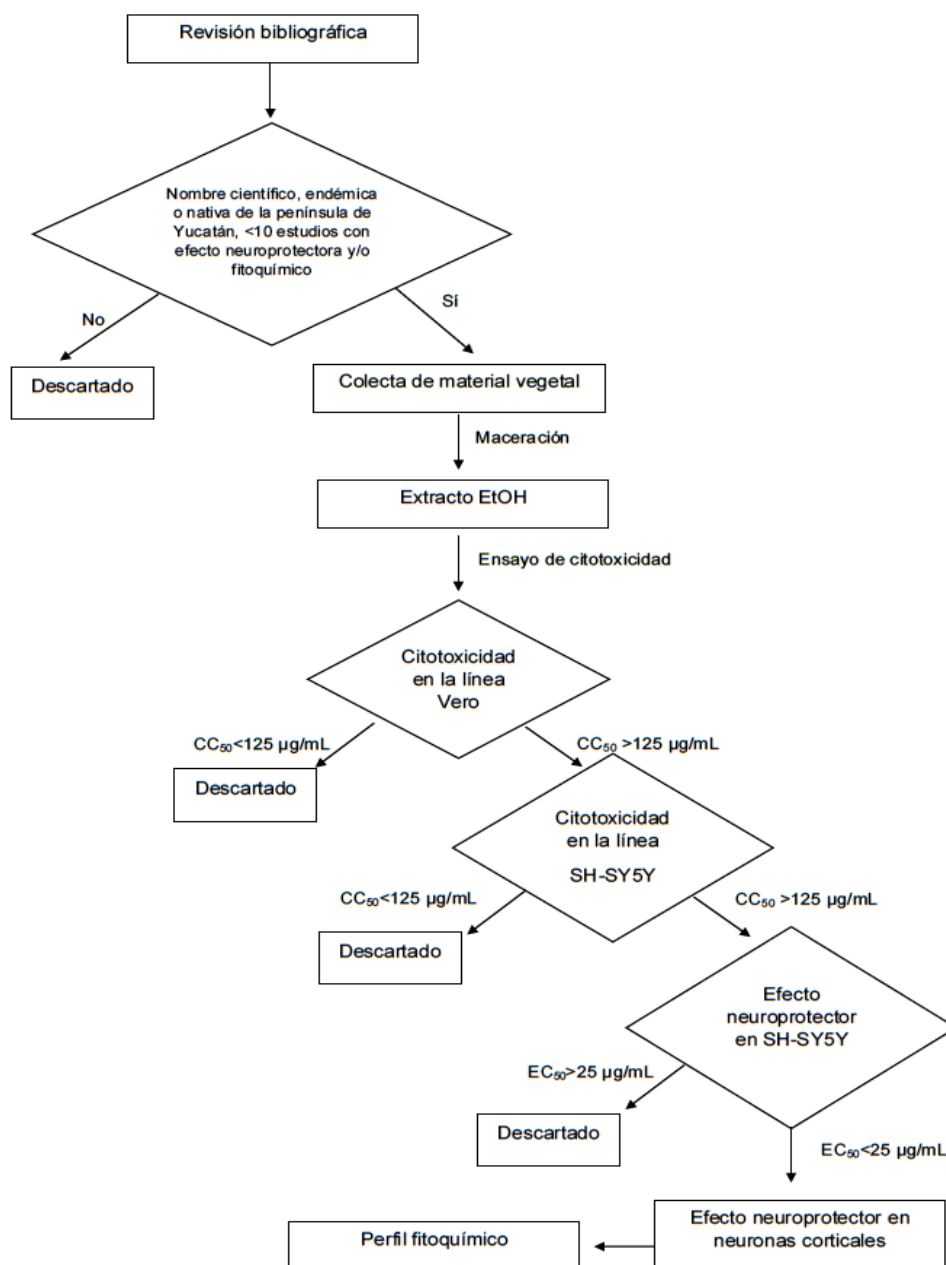


Figura 1.5 Estrategia experimental para la búsqueda de extractos con efecto neuroprotector.

CAPÍTULO II

Tamizaje de plantas utilizadas en la medicina tradicional maya con potencial efecto neuroprotector

2.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva y selectiva de las células que se encuentran en el sistema nervioso, limitando a la persona de manera física y/o mental (Guo *et al.*, 2013). Además de las neuronas, existen otras células que se encuentran en el sistema nervioso tales como las células gliales: astrocitos, oligodendrocitos y microglías (Zwain y Yen, 1999). Los astrocitos se encargan de mantener la transmisión sináptica, defensa antioxidante, homeostasis iónico y metabólico, soporte trófico, así como protección a las neuronas (Rock *et al.* 2004; Wang y Qin, 2010), los oligodendrocitos producen mielina y las microglías son células involucradas en el sistema inmune (Domingues *et al.*, 2016).

Las neuronas son susceptibles al estrés oxidativo que, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, es el desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la destoxificación por enzimas y agentes quelantes (Lin y Flint Beal, 2006; Sayre *et al.*, 2008). Este tipo de daño puede ser inducido por glutamato, un neurotransmisor que si se encuentra en altas concentraciones en el espacio extracelular causa la pérdida de homeostasis de calcio en las neuronas, generación de EROs y pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (Guo *et al.*, 2013; Prentice *et al.*, 2015).

La línea celular de neuroblastoma humana SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) ha sido utilizada para el modelo de daño por estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Kich *et al.*, 2016; Yew *et al.*, 2015), el Alzheimer (Sun *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010), y modelos en donde se encuentran involucrados otros procesos como la muerte celular programada (Pregi *et al.*, 2006).

La corteza cerebral es una lámina de sustancia gris que forma parte de la base (piso) de los hemisferios cerebrales y consiste de neuronas llamadas neuronas corticales, astrocitos y oligodendrocitos. Estas neuronas están compuestas principalmente por dos tipos: las piramidales y las no piramidales. Las neuronas piramidales son

aproximadamente el 80% de las neuronas y utilizan el glutamato como neurotransmisor excitatorio (neuronas glutamatérgicas). Las neuronas no piramidales o interneuronas poseen una morfología heterogénea y en la población existen excitatorias e inhibitorias utilizando como neurotransmisores glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), respectivamente (Rubenstein, 2011; Valverde, 2002).

Las neuronas corticales son susceptibles a la excitotoxicidad, un tipo de muerte neuronal causado por la sobreactivación de los receptores de glutamato, provocando un desbalance de calcio en las neuronas y activando enzimas (lipasas, fosfolipasas, endonucleasas, entre otras) que degradan componentes estructurales de las neuronas (Berliocchi *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2009).

El cultivo primario de neuronas corticales de mamíferos (humano, rata, ratón, entre otros) es utilizado como modelo de excitotoxicidad en enfermedades neurológicas (Geranmayeh *et al.*, 2015), así como con otros agentes inductores de daño neuronal, tales como peróxido de hidrógeno, proteína β -amiloide, 4-hidroxinonenal y NMDA (Cui *et al.*, 2016; Limpeanchob *et al.*, 2008; Meloni *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016).

El modelo de rata (*Rattus norvegicus*) consiste en el aislamiento de las células de la corteza cerebral de embriones de 14 a 18 días; las células se siembran en una superficie pretratada de poli-L-ornitina, fibronectina y laminina y se mantiene en promedio 7-10 días para la maduración de las neuronas (Darbinyan *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2012).

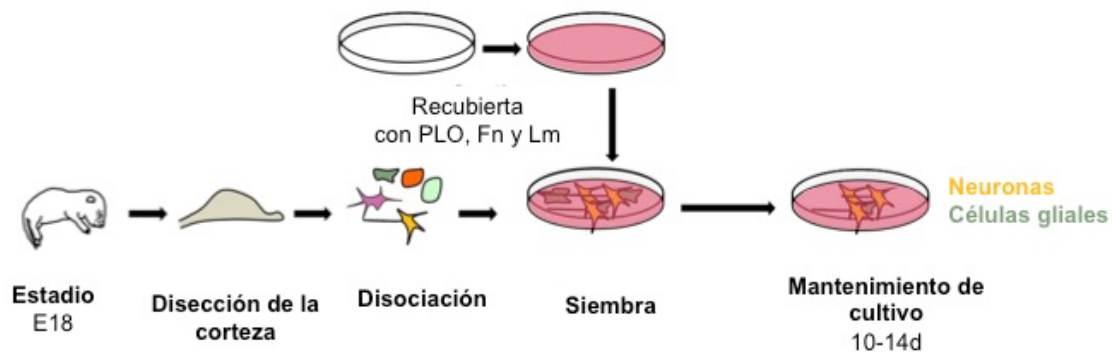


Figura 2.1 Esquema del cultivo primario de neuronas corticales de rata. E18: embrión de 18 días, PLO: Poli-L-ornitina, Fn: Fibronectina y Lm: Laminina

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz para prevenir y/o tratar este grupo de enfermedades, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos, siendo los productos naturales una alternativa atractiva.

En Yucatán existen registros sobre especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya (Osadao, 1834; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003), siendo una fuente de consulta para obtener especies candidatas a tener un efecto neuroprotector. A pesar de que no se menciona el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en particular, algunos reportes describen tratamientos para síntomas sugerentes a éstas como dolor de cabeza, convulsiones, depresión, demencia, pérdida del habla, pérdida de la orientación, neuralgia y “mal de nervios”.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es la búsqueda de extractos con efecto neuroprotector de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Selección y obtención del extrato etanólico de las especies vegetales

2.2.1.1 Búsqueda bibliográfica

La selección de las especies vegetales en este estudio está basada en la información etnobotánica maya proporcionada por dos fuentes literarias (Osadao, 1834; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). Las especies vegetales fueron seleccionadas de acuerdo a estos criterios: 1) Que la especie vegetal sea utilizada para algún(os) síntoma(s) sugerente(s) a alguna enfermedad neurológica como: dolor de cabeza, convulsiones, depresión, demencia, pérdida del habla, pérdida de la orientación, neuralgia y “mal de nervios”; 2) Que la literatura etnobotánica mencionara el nombre científico (género y especie); 3) Que la especie vegetal sea endémica o nativa de la península de Yucatán; 4) Que no existan más de 10 estudios relacionados con efecto neuroprotector y/o fitoquímico de la especie vegetal.

2.2.1.2 Material Vegetal

El material vegetal fue colectado los días 20 de agosto de 2015, 10 de septiembre de 2015 y 27 de junio de 2016 en Sierra Papacal y Hunucmá de Yucatán y en Chetumal, Quintana Roo. El material fue identificado y autenticado por el Téc. Paulino Simá Polanco,

de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Los ejemplares colectados junto con sus números de colecta fueron depositados en el herbario *U Najil Tikin Xiw* del CICY.

2.2.1.3 Preparación del extracto

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente por 48 h y luego a 40 °C por 48 h en un desecador de luz continua. Se separaron las partes de las plantas en hojas, corteza y tallos, partes aéreas y raíces o como planta completa, las cuales fueron molidas en un molino de la marca Pagani. Se tomaron 20 g de cada parte de la planta y se extrajo por maceración con etanol por 72 h a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron filtrados y concentrados al vacío con la ayuda de un evaporador rotatorio para obtener el extracto etanólico.

2.2.1.4 Preparación de la disolución madre

Muestras de 50 mg de cada extracto fueron solubilizadas con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 50 mg/mL.

2.2.2 Modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato

2.2.2.1 Cultivo celular

La línea celular normal de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Vero, ATCC® CCL-81™) y la línea celular de neuroblastoma humana (SH-SY5Y ATCC® CRL-2266™) de la American Type Culture Collection (ATCC) fueron cultivadas en cajas estériles T-25, conteniendo el medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (10%, v/v) en el caso de las células Vero y en medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino (15%, v/v) para las células SH-SY5Y. Ambas líneas se mantuvieron con 100 U/mL de penicilina G y 100 µg/mL de estreptomycin a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ (95% de humedad).

2.2.2.2 Ensayo citotóxico en las líneas celulares Vero y SH-SY5Y

La actividad citotóxica de los extractos se evaluó con la línea celular Vero por el método de sulforodamina B (SRB) para la medición de la viabilidad celular; la SRB se une a las proteínas básicas de las células que se encuentran viables (Vanicha y Kirtikara, 2006).

En el caso del ensayo con la línea celular SH-SY5Y, los extractos se evaluaron por el método de éster de acetoximetilo de calceína (calceína AM); este compuesto fluorogénico y sustrato de esterasas que cruza pasivamente la membrana celular y es utilizado para determinar la viabilidad celular. Dentro de las células es convertido por las esterasas intracelulares a un producto polar fluorescente (calceína) que es retenido por las células que poseen la membrana celular intacta (células viables), produciendo una fluorescencia verde (Neri *et al.*, 2001).

A las células en cajas T-25 con un 90-100% de confluencia se les adicionó 1 mL de tripsina-EDTA (1×) y se incubaron por 10 min a 37 °C, luego se recuperaron las células y fueron resuspendidas en 1 mL de medio, después se contabilizaron con azul de tripano en una cámara de Neubauer. En placas de 96 pozos se sembró 1×10^5 células/mL y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Después de 24 h se procedió a realizar los ensayos.

Para los ensayos, se reemplazó el medio y se expuso a las células con los extractos a las concentraciones de 500, 250, 125 y 62.5 µg/mL por 48 h a 37 °C con 5% de CO₂. Terminado el tiempo de incubación, las células fueron tratadas con un revelador según cada método. Para las células Vero, se realizó una fijación con ácido tricloroacético al 10%, luego se agregó la sulforrodamina B (0.1%), posteriormente se realizaron lavados con ácido acético al 1% y por último se le adicionó Tris-base 10 mM y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 554 nm. Para las células SH-SY5Y, se le adicionó calceína AM (4 µM) y se incubó por 30 min a 37 °C con 5% de CO₂, luego se realizaron dos lavados con PBS 1× (pH 7.4) y se realizó la lectura en un espectrofotómetro con una de excitación de 480 y de emisión de 520 nm.

2.2.2.3 Ensayo de neuroprotección contra estrés oxidativo inducido por glutamato

El modelo propuesto para la realización del tamizaje es el daño por estrés oxidativo inducido por glutamato en la línea celular SH-SY5Y (Zhu *et al.*, 2015).

Para determinar el efecto neuroprotector se realizó la siembra (1×10^5 células/mL) en placas de 96 pozos como en el procedimiento antes descrito. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con los extractos a las concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente fueron tratadas con glutamato 25 mM por 30 min, se les retiró el glutamato y se añadió medio nuevo y se incubó por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. (Taveira *et al.*, 2014). Terminado el tiempo de incubación, se le adicionó calceína

AM (4 μ M) y se incubó por 30 min a 37 °C con 5% de CO₂, luego se realizaron dos lavados con PBS 1× (pH 7.4) y se realizó la lectura en un espectrofotómetro con un filtro de fluorescencia de excitación de 480 y de emisión de 520 nm.

2.2.2.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Los niveles generados de las especies reactivas de oxígeno en células SH-SY5Y se midieron con el cloro metil 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (CM-H2DCFHDA). El principio consiste en que el CM-H2DCFH-DA cruza la membrana y es hidrolizada por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorofluoresceína (CM-H2DCFH) que no es fluorescente. En presencia de EROs, como peróxido de hidrógeno, hidroxiperoxidasas y peroxinitritos, H2CM-DCFH es oxidada a un compuesto fluorescente. La fluorescencia es proporcional a la cantidad de EROs generada (Chen *et al.*, 2010).

En placas de 96 pozos se realizó la siembra (1×10^5 células/mL) como en el procedimiento antes descrito. Para la determinación de EROs, las células se trataron con los extractos a 25 μ g/mL por 24 h, luego se indujo el daño con glutamato 12.5 mM por 30 min. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se añadió medio DMEM/F12 (1:1) sin rojo de fenol con CM-H2DCFHDA a 10 μ M por 30 min a 37 °C, 5% de CO₂ y protegido de la luz (Shi *et al.*, 2014). Finalmente, la placa se leyó en un espectrofotómetro con el filtro de fluorescencia de excitación de 490 nm y de emisión de 510-570 nm.

2.2.2.5 Determinación del potencial de la membrana mitocondrial

La pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (PMM) es un proceso que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas. El PMM en las células SH-SY5Y se midió con la rodamina 123 (Rho123). El principio se basa en que cuando se encuentra en un alto nivel el PMM, la Rho123 es concentrada en la matriz mitocondrial, mientras que cuando el potencial es bajo, la Rho123 es liberada, disminuyendo la fluorescencia de ésta (Baracca *et al.*, 2003).

En placas de 96 pozos se realizó la siembra (1×10^5 células/mL) como en el procedimiento antes descrito. Para la determinación del PMM en las células SH-SY5Y, se realizó el tratamiento con los extractos a 25 μ g/mL por 24 h, luego el daño inducido con glutamato a 12.5 mM por 30 min. Posteriormente, se adicionó Rho123 (5 μ M) y se incubó por 30 min a 37 °C, 5% de CO₂ y protegido de la luz ambiental. Terminado el tiempo de

incubación, se realizó dos lavados con PBS 1× (pH 7.4) (Wang *et al.*, 2013). Finalmente, la placa se leyó en un espectrofotómetro con el filtro de fluorescencia de excitación 490 nm y de emisión de 510-570 nm.

2.2.3 Modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato

2.2.3.1 Animales experimentales

Embriones de 18 días (E18) de ratas Wistar fueron utilizados para el aislamiento de neuronas corticales. Las ratas gestantes se mantuvieron a 22 ± 2 °C con un ciclo de día/oscuridad de 12/12 h y se les proporcionó el agua y alimento *ad libitum*. A las ratas se les indujo anestesia con sevoflurano y posteriormente fueron sacrificadas por decapitación.

2.2.3.2 Aislamiento de neuronas corticales primarias

Se realizó la disección de las cortezas cerebrales de los embriones y se colocaron en medio N2B27. Las cortezas se trituraron con una hoja de bisturí y se les añadió tripsina 0.25% (1 µL/mL) y se incubaron a temperatura ambiente por 45 s. Para recuperar las células, éstas se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 min. Se realizó la tinción por exclusión con azul de tripano para contabilizar las células viables.

2.2.3.3 Inmunotinción

Para la identificación de la población celular se realizó una inmunotinción con tres anticuerpos: β -Tubulina clase III (Tuj1) para células neuronales, O4 para oligodendrocitos y GFAP para células gliales (Lee *et al.*, 1990). En placa de 96 pozos se sembraron 5×10^5 células/mL, éstas se mantuvieron 10-14 días *in vitro* (DIV) con cambios de la mitad de medio cada dos días. La fijación se realizó con paraformaldehído 4% por 24 h, luego se le adicionó una disolución de bloqueo (PBS 1× con 10% de suero de cabra y 0.25% de Tritón X-100) y se incubó por una hora a temperatura ambiente, terminada la incubación se realizaron dos lavados con PBS 1× con 0.1% de albúmina bovina. Se adicionó los anticuerpos primarios: Tuj1 (1:500), O4 (1:25), y GFAP (1:500) y se incubó por 24 h a 4 °C, se realizaron dos lavados con PBS 1× con 0.1% de albúmina bovina y se le adicionaron los anticuerpos secundarios Alexa 488 (1:500) y Alexa 568 (1:300) con 2 h de incubación a temperatura ambiente, terminando la incubación se realizaron dos lavados

con PBS 1× con 0.1% de albúmina bovina. Para la tinción de núcleos se adicionó Hoescht 33258 (1:100) por 5 min, luego se realizaron dos lavados con PBS 1× y se observaron en el microscopio invertido de fluorescencia. La cuantificación se realizó con el programa ImageJ.

2.2.3.4 Ensayo de citotoxicidad en neuronas corticales

Se sembraron 5×10^5 células/mL en placa de 96 pozos. Las células se mantuvieron 10-14 DIV con cambios de la mitad de medio cada dos días. Para los ensayos, se reemplazó el medio y se expuso a las células con los extractos a las concentraciones de 500, 250, 125 y 62.5 µg/mL por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Terminado el tiempo de incubación, se les adicionó calceína AM (4 µM) y se incubaron por 30 min a 37 °C con 5% de CO₂, luego se realizaron dos lavados con PBS (pH 7.4) y se leyó en un espectrofotómetro con una longitud de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 520 nm.

2.2.3.5 Ensayo de neuroprotección en neuronas corticales

Para determinar el efecto neuroprotector se realizó la siembra en placas de 96 pozos (5×10^5 células/mL) como en el procedimiento antes descrito. Las neuronas corticales fueron tratadas con los extractos a las concentraciones de 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente fueron tratadas con 12.5 mM de ácido glutámico por 30 min (Geranmayeh *et al.*, 2015; Zhang y Bhavnani, 2005), se realizó el cambio de medio y se incubó por 24 h. Terminado el tiempo de incubación se reveló con calceína AM como se encuentra anteriormente descrito.

2.2.4 Análisis estadístico

El análisis de los datos de los ensayos se realizó por triplicado; para calcular la concentración efectiva media (CE₅₀) en los ensayos de neuroprotección se utilizaron las medias y las desviaciones estándar. Para el análisis de potencial de membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno se utilizó análisis de varianza de una vía comparado con el daño inducido por glutamato.

2.2.5 Perfil cromatográfico

Para la obtención de los perfiles cromatográficos de los extractos activos se utilizó el cromatógrafo modelo 1260 *Infinity* de la marca *Agilent* con una bomba cuaternaria,

automuestreador, compartimento de columna termostatzada (35 °C) y un detector de arreglo de diodos (DAD). Una precolumna extend C-18 (4.6 × 12.5 mm, 4.5 µm) y una columna C-18 Hypersilgold (4.6 × 150 mm, 5 µm) con un flujo de 1 mL/min con gradientes de H₂O con 3% de ácido acético (CH₃COOH, disolvente A) y acetonitrilo (C₂H₃N, disolvente B).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Especies vegetales seleccionadas para el estudio

De las 51 especies vegetales encontradas en la literatura para el tratamiento de síntomas sugerentes a enfermedades neurológicas, 38 cubrieron los criterios antes descritos (Cuadro 2.1), de las cuales, 34 fueron colectadas y las cuatro restantes no fueron incluidas en este estudio por la dificultad de obtenerlas debido a su localización geográfica (Cuadro 2.2). Las 13 especies que se descartaron en este estudio fue porque presentaron más de diez estudios fitoquímicos y/o reportes de efecto neuroprotector (Cuadro 2.3).

Debido a que las especies vegetales fueron divididas de acuerdo a sus partes (hojas y tallos, partes aéreas y raíces o planta completa) se obtuvo un total de 65 extractos etanólicos (Cuadro 2.4).

Los extractos que obtuvieron los mayores rendimientos (Cuadro 2.4) fueron los extractos de las raíces de *Isotoma longiflora* (28.55%), de la planta completa *Tradescantia spathacea* (21.63%) y de las hojas de *Piper gaumeri* (21.25%).

Cuadro 2.1 Especies vegetales seleccionadas en este estudio.

Especie ^a	Familia	Nombre común y/o maya ^a	Status ^b	Uso ^a
<i>Acalypha unibracteata</i> Muell. Arg. (P. Simá 3165)	Euphorbiaceae	<i>Ch'ilibtux</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Adiantum tenerum</i> Sw. (P. Simá 3203)	Pteridaceae	--	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Caesalpinia gaumeri</i> Greenm. (P. Simá 3166)	Fabaceae	<i>Kitam che'</i>	Nativa	Epilepsia
<i>Canna indica</i> L. (P. Simá 3200)	Cannaceae	<i>Chan Kaia</i>	Nativa	Dolores nerviosos
<i>Clusia flava</i> Jacq. (P. Simá 3175)	Clusiaceae	<i>K'anchunuup</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Crateva tapia</i> L. (P. Simá 3176)	Capparaceae	<i>Kolok max</i>	Nativa	Mal de nervios
<i>Croton schiedeana</i> Schltdl. (P. Simá 3196)	Euphorbiaceae	<i>Chul, chulche', ch'uju che', petsk'uuts, copalche', palo santo</i>	Nativa	Convulsiones
<i>Dalea carthagenensis</i> (Jacq.) J. F. Macbr (P. Sima 3178)	Fabaceae	<i>Ch'o'</i>	Nativa	Depresión
<i>Dalechampia scandens</i> L. (P. Simá 3174)	Euphorbiaceae	<i>Molkoh</i>	Nativa	Dolor de cabeza y epilepsia
<i>Diphyssa carthagenensis</i> Jacq. (P. Simá 3167)	Fabaceae	<i>Xts'uts'uk</i>	Nativa	Epilepsia
<i>Ehretia tinifolia</i> L. (P. Simá 3180)	Boraginaceae	<i>Bec o beek</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Elytraria imbricata</i> (Vahl) Pers. (P. Simá 3187)	Acanthaceae	<i>Cabal che</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Harpalyce rupicola</i> Donn. Sm. (P. Simá 3198)	Fabaceae	<i>K'an chan te'</i>	Nativa	Convulsiones
<i>Helicteres baruensis</i> Jacq. (P. Simá 3168)	Sterculiaceae	<i>Tsutsup</i>	Nativa	Epilepsia
<i>Isotoma longiflora</i> (L.) Presl. (P. Simá 3201)	Campanulaceae	<i>Luk'sahtan o sahtahan</i>	Nativa	Epilepsia
<i>Justicia spicigera</i> Schltdl. (P. Simá 3183)	Acanthaceae	<i>chak lool, ts'l'its, sacatinta o yich can</i>	Nativa	Dolor de cabeza y epilepsia

^aOsadao (1834), Arellano-Rodriguez *et al.* (2003). ^bFernandez *et al.* (2010). ^cEspecies sugeridas por el Dr. Rafael Durán García de la Unidad de Recursos Naturales, CICY.

Cuadro 2.1 Continuación.

Especie^a	Familia	Nombre común y/o maya^a	Status^b	Uso^a
<i>Lasiacis divaricata</i> (L.) Hitchc ^c (P. Simá 3184)	Poaceae	<i>Siit</i>	Nativa	Demencia, dolor de cabeza y pérdida de orientación
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit (P. Simá 3164)	Fabaceae	<i>Waxim</i>	Nativa	Dolor de cabeza.
<i>Lisianthus axillaris</i> (Hemsl) Kuntze (P. Simá 3199)	Gentianaceae	<i>Xputsche</i>	Endémica	Mal de nervios
<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav. (P. Simá 3172)	Malvaceae	<i>Bisilk'aax o bisikax</i>	Nativa	Epilepsia
<i>Manfreda brachystachya</i> (Cav.) Rose ^c (P. Simá 3188)	Agavaceae	<i>Pets' kinil</i>	Endémica	Dolor de cabeza
<i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urb. (P. Simá 3173)	Anacardiaceae	<i>Kabab o cheechem</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Mimosa bahamensis</i> Benth. (P. Simá 3169)	Fabaceae	<i>Katzim</i>	Nativa	Dolor de cabeza, epilepsia, estimulante y fatiga.
<i>Pilocarpus racemosus</i> Vahl. ^c (P. Simá 3189)	Rutaceae	<i>Tankasche'</i>	Nativa	Dolor de cabeza y mal nervios
<i>Piper gaumeri</i> Trel. (P. Simá 3197)	Piperaceae	<i>K'uk'sub o xpeheche</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Pluchea odorata</i> (L.) Cass. (P. Simá 3171)	Asteraceae	<i>Chalche'</i>	Nativa	Convulsiones, dolor de cabeza, pérdida del habla, mal espasmódico y neuralgia
<i>Schwenckia americana</i> (L.) D. Royen ^c (P. Simá 3185)	Solanaceae	<i>Xayúu lool xiiw</i>	Nativa	Depresión
<i>Tetramerium nervosum</i> Nees. (P. Simá 3186)	Acanthaceae	<i>Baak soots', sak ch'ikib, xk'uch'eel, bak zo'odz'</i>	Nativa	Dolor de cabeza

^aOsadao (1834), Arellano-Rodríguez *et al.* (2003). ^bFernandez *et al.* (2010). ^cEspecies sugeridas por el Dr. Rafael Durán García de la Unidad de Recursos Naturales, CICY.

Cuadro 2.1 Continuación.

Especie^a	Familia	Nombre común y/o maya^a	Status^b	Uso^a
<i>Thouinia paucidentata</i> Radlk. (P. Simá 3170)	Sapindaceae	<i>K'anchunup</i>	Endémica	Dolor de cabeza
<i>Tillandsia streptophylla</i> Scheidw. ex C. Morren (P. Simá 3202)	Bromeliaceae	<i>Hk'olomxal</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Tradescantia spathacea</i> Sw. ^c (P. Simá 3191)	Commelinaceae	<i>Chak tsam, ej pets'</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Urera baccifera</i> (L.) Gaudich. ex Wedd. (P. Simá 3195)	Urticaceae	<i>Laal</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Vitex gaumeri</i> Greenm. (P. Simá 3182)	Lamiaceae	<i>Ya'axnik</i>	Nativa	Dolor de cabeza
<i>Zanthoxylum caribaeum</i> Lam. ^c (P. Simá 3190)	Rutaceae	<i>Si na'an ché ik</i>	Nativa	Epilepsia y anestésico.

^aOsadao (1834), Arellano-Rodríguez *et al.* (2003). ^bFernandez *et al.* (2010). ^cEspecies sugeridas por el Dr. Rafael Durán García de la Unidad de Recursos Naturales, CICY.

Cuadro 2.2 Especies vegetales que fueron descartadas en este estudio debido a la dificultad de localizarlas geográficamente.

Especie^a	Familia	Nombre común y/o maya^a	Status^b	Uso^a
<i>Angelonia angustifolia</i> Benth.	Scrophulariaceae	<i>Xta'ulum</i>	Nativa	Estimulante
<i>Calonyction aculeatum</i> (L.) House	Convolvulaceae	<i>Lol colebil</i>	Nativa	Parálisis
<i>Conocarpus erectus</i> L.	Combretaceae	<i>Can che o sackokob che</i>	Nativa	Calmante y dolores nerviosos
<i>Dioscorea convolvulacea</i> Schlecht. & Cham.	Dioscoreaceae	<i>Cheenchak, makal o k' uuch,</i>	Nativa	Dolor de cabeza

^aOsadao (1834), Arellano-Rodríguez *et al.* (2003). ^bFernandez *et al.* (2010)

Cuadro 2.3 Especies vegetales que fueron descartadas en este estudio.

Especie ^a	Familia	Nombre común y/o maya ^a	Status ^b	Uso ^a	CR ^c	AB ^c
<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Fabaceae	<i>Kan ix che</i>	Nativa	Mal nervios	28	14
<i>Ageratum gaumeri</i> B.L. Rob. ^d	Asteraceae	--	Endémica	Dolor de cabeza	0	0
<i>Asclepias curassavica</i> L.	Apocynaceae	<i>Sac cancel xiu</i>	Nativa	Dolor de cabeza	21	28
<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	Burseraceae	<i>Chakah, chakchakan, palo chino</i>	Nativa	Dolor de cabeza	6	22
<i>Cestrum nocturnum</i> L.	Solanaceae	<i>Aak'a xiiw</i>	Nativa	Epilepsia y contra espasmos	5	15
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Amaranthaceae	<i>Lukum, luku'um xiw, epazote</i>	Nativa	Mal de San vito	47	4
<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	Fabaceae	<i>Sak ya 'ab, cocolito</i>	Endémica	Dolor de cabeza	17	1
<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	Fabaceae	<i>Ch'oj xiiw</i>	Nativa	Epilepsia	10	7
<i>Plumeria rubra</i> L.	Apocynaceae	Flor de mayo	Nativa			
<i>Rauvolfia tetraphylla</i> L.	Apocynaceae	<i>Chacmukak, cabal muc</i>	Nativa	Dolor de cabeza	12	7
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (L.) Vahl	Verbenaceae	<i>Ibin xiu, verbena kax</i>	Nativa	Analgesico y calmante	12	9
<i>Tabebuia pentaphylla</i> L.	Bignoniaceae	<i>Hokab</i>	Nativa	Dolor de cabeza	22	8
<i>Turnera diffusa</i> Willd	Turneraceae	<i>Misib coc</i>	Nativa	Debilidad cerebral	13	12

CR: compuestos reportados, AB: Reportes de actividad biológica. ^aOsadao (1834), Arellano-Rodríguez *et al.* (2003). ^bFernández *et al.* (2010). ^cBase de datos (NapraletTM, PubmedTM, ScienceDirectTM). ^dEs estudiada en otro grupo de investigación de la misma institución.

2.3.2 Citotoxicidad de los extractos en ambas líneas celulares

Los extractos fueron descartados cuando mostraron una CC₅₀ menor a 125 µg/mL en el ensayo de citotoxicidad para ambas líneas celulares; en el caso de la línea celular normal Vero fueron cuatro los extractos que resultaron citotóxicos y en la línea celular SH-SY5Y fueron 12 extractos (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Actividad citotóxica de los extractos de las especies vegetales.

Especie	Parte de la planta	Rendimiento (%)	Citotoxicidad CC ₅₀ (µg/mL)	
			Vero	SH-SY5Y
<i>Acalypha unibracteata</i>	PA	8.40	-	-
<i>Adiantum tenerum</i>	PA	7.98	-	-
	R	4.27	-	-
<i>Caesalpinia gaumeri</i>	H	11.73	-	49.8 ± 4.9
	T	4.89	-	-
<i>Canna indica</i>	PA	14.11	109.4 ± 3.9	ND
	R	11.01	-	-
<i>Clusia flava</i>	H	2.26	-	59.3 ± 3.8
	T	4.85	-	-
<i>Crateva tapia</i>	H	2.67	-	53.8 ± 4.2
	T	3.62	-	-
<i>Croton schiedeana</i>	H	15.44	88.4 ± 3.6	ND
	T	9.28	-	-
	C	6.82	-	74.1 ± 4.4
<i>Dalea carthagenensis</i>	PA	5.64	-	-
	R	1.70	-	-
<i>Dalechampia scandens</i>	PA	8.10	-	-
<i>Diphysa carthagenensis</i>	H	4.08	-	-
	T	4.51	-	-
<i>Ehretia tinifolia</i>	H	4.48	-	-
	T	3.36	-	-
<i>Elytraria imbricata</i>	PA	10.99	-	-
	R	6.63	-	-
<i>Harpalyce rupicola</i>	H	15.91	22.5 ± 4.5	ND
	T	6.62	-	94.0 ± 3.8
<i>Helicteres baruensis</i>	H	6.66	-	-
	T	2.82	104.3 ± 2.8	ND
<i>Isotoma longiflora</i>	PA	14.54	-	-
	R	28.55	-	-

H: Hoja, T: Tallo, PA: Partes aéreas, R: Raíz, C: Corteza, PC: Planta completa

-: >125 µg/mL, ND: No determinado

Cuadro 2.4 Continuación.

Especie	Parte de la planta	Rendimiento (%)	Citotoxicidad CC ₅₀ µg/mL	
			Vero	SH-SY5Y
<i>Justicia spicigera</i>	PA	6.11	-	-
	R	5.35	-	-
<i>Lasiacis divaricata</i>	PA	5.06	-	-
	R	1.14	-	-
<i>Leucaena leucocephala</i>	H	7.01	-	-
	T	8.13	-	-
<i>Lisianthus axilaris</i>	PA	17.35	-	-
	R	12.46	-	-
<i>Malvaviscus arboreus</i>	H	14.94	-	-
	T	3.67	-	-
<i>Manfreda brachystachya</i>	PC	9.85	-	-
<i>Metopium brownei</i>	H	10.19	-	-
	T	6.26	-	44.8 ± 2.1
<i>Mimosa bahamensis</i>	H	3.84	-	-
	T	2.75	-	-
<i>Pilocarpus racemosus</i>	H	13.09	-	-
	T	2.28	-	-
<i>Piper gaumeri</i>	H	21.25	-	57.3 ± 4.7
	T	17.45	-	86.5 ± 2.9
	C	12.03	-	-
<i>Pluchea odorata</i>	H	10.23	-	50.7 ± 4.4
	T	3.99	-	-
<i>Schwenkia americana</i>	PA	7.61	-	-
	R	2.38	-	-
<i>Tetramerium nervosum</i>	PA	4.96	-	67.2 ± 3.5
	R	2.44	-	-
<i>Thouina paucidentata</i>	H	9.05	-	80 ± 1.7
	T	3.70	-	-

H: Hoja, T: Tallo, PA: Partes aéreas, R: Raíz, C: Corteza, PC: Planta completa

-: >125 µg/mL

Cuadro 2.4 Continuación.

Especie	Parte de la planta	Rendimiento (%)	Citotoxicidad CC ₅₀ µg/mL	
			Vero	SH-SY5Y
<i>Tillandsia streptophylla</i>	PC	15.27	-	-
<i>Tradescantia spathacea</i>	PC	21.63	-	-
<i>Urera baccifera</i>	H	13.95	-	-
	T	10.32	-	-
<i>Vitex gaumeri</i>	H	8.82	-	-
	T	2.90	-	-
<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	H	4.54	-	65.4 ± 1.7
	T	2.17	-	-

H: Hoja, T: Tallo, PA: Partes aéreas, R: Raíz, C: Corteza, PC: Planta completa, -: >125 µg/mL.

2.3.3 Neuroprotección de los extractos en el modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato

A pesar de que no existe un criterio para definir un extracto activo en el caso de los ensayos de neuroprotección, De acuerdo a la revisión que se realizó y se discutirá en el siguiente apartado, en este estudio se consideró un extracto con efecto neuroprotector cuando la concentración efectiva media (CE₅₀) sea menor o igual a 25 µg/mL, debido a que no se ha establecido una concentración efectiva media (CE₅₀) para determinar si un compuesto o extracto tiene efecto neuroprotector, en este trabajo se consideró, con base en las concentraciones reportadas en la literatura (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5 Especies vegetales reportadas con efecto neuroprotector.

Modelo utilizado	Especie	Parte de la planta que se obtuvo el extracto	Concentración efectiva media ($\mu\text{g/mL}$)	Referencia
Estrés oxidativo en SH-SY5Y	<i>Lannea schweinfurthii</i>	Corteza	3.125	Seoposengwe <i>et al.</i> , 2013
	<i>Scadoxus puniceus</i>	Bulbos	6.25	Seoposengwe <i>et al.</i> , 2013
	<i>Casteana sativa</i>	Corteza	50	Brizi <i>et al.</i> , 2016
Excitotoxicidad en neuronas corticales de rata	<i>Mangifera indica</i>	Corteza	2.5	Lemus-Molina <i>et al.</i> , 2009
	<i>Polygonum multiflorum</i>	Raíces	5	Jang <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lonicera japonica</i>	Flores	40	Weon <i>et al.</i> , 2011

El ácido ascórbico se utilizó como control positivo debido a su actividad antioxidante y efecto neuroprotector mostrados previamente en la línea celular SH-SY5Y (May *et al.*, 2006; Nunome *et al.*, 2008). Esta molécula se oxida cuando dona un átomo de hidrógeno a una reacción enzimática o como neutralizador de radicales libres, también recicla otros antioxidantes como el α -tocoferol (May, 2012).

El porcentaje de viabilidad que presentó el daño inducido por glutamato (25 μM) fue de $47.29 \pm 5.61\%$, es decir, que más del 50% de las células mueren por la presencia del glutamato. El ácido ascórbico mostró efecto protector a una $\text{CE}_{50} = 20.0 \pm 1.5 \mu\text{M}$, por lo que en los siguientes ensayos se decidió utilizar esa concentración.

Los extractos que resultaron con efecto neuroprotector (CE_{50} menor a 25 $\mu\text{g/mL}$) fueron un total de seis (Cuadro 2.6), siendo el extracto de raíz de *Schwenkia americana* el que presentó la mejor actividad ($\text{CE}_{50} = 11.3 \pm 2.9$).

Cuadro 2.6 Concentración efectiva media de los extractos neuroprotectores en el modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato.

Especie	Parte de la planta	CE ₅₀ (µg/mL)
<i>Elytraria imbricata</i>	Partes aéreas	18.4 ± 2.3
<i>Isotoma longiflora</i>	Raíz	13.1 ± 1.6
<i>Mimosa bahamensis</i>	Tallo	15.4 ± 3.0
<i>Schwenkia americana</i>	Partes aéreas	16.7 ± 2.2
	Raíz	11.3 ± 2.9
<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	Tallo	23.9 ± 2.1
Ácido ascórbico (µM)		20.0 ± 1.5

2.3.4 Efecto de los extractos sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y la pérdida de potencial mitocondrial inducida por glutamato

Los seis extractos con efecto neuroprotector se evaluaron para determinar si disminuyen la generación de EROs inducido por la presencia de glutamato.

En los ensayos se utilizó como control positivo el ácido ascórbico a 20 µM y los pretratamientos con los extractos a 25 µg/mL por 24 h.

Al tratar a las células con glutamato a 12.5 µM por 30 min, se observó una fluorescencia relativa (con respecto al control con el vehículo) de 1.80 ± 0.04 , indicando una elevación de las EROs. El ácido ascórbico (control positivo) presentó una fluorescencia relativa de 0.95 ± 0.17 , por lo que el pretratamiento con este compuesto disminuye la generación de las EROs. Las fluorescencias relativas de los tratamientos con los diferentes extractos fueron, EIPA: 1.73 ± 0.11 , ILR: 1.70 ± 0.30 , MBT: 1.14 ± 0.13 , SAPA: 1.29 ± 0.04 , SAR: 1.36 ± 0.04 y ZCT: 1.62 ± 0.01 , siendo los extractos de MBT y SAPA los que mostraron efecto significativo en la disminución de EROs (Figura 2.2).



Figura 2.2 Efecto de los extractos en la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por glutamato a 12.5 μ M por 30 min. GLU: Glutamato, AA: Ácido ascórbico, EIPA: Partes aéreas de *Elytraria imbricata*, ILR: Raíces de *Isotoma longiflora*, MBT: Tallos de *Mimosa bahamensis*, SAPA: Partes aéreas de *Schwenckia americana*, SAR: Raíces de *Schwenckia americana* y ZCT: Tallos de *Zanthoxylum caribaeum*. Análisis estadístico: Datos normalizados con respecto al control negativo (sin tratamiento), análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) frente al tratamiento con glutamato, con corrección de Dunnett, $F(7, 40) = 18.18$ $p < 0.0001$. Diferencia significativa *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Se determinó si los extractos previenen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida por el glutamato. Para estos ensayos se utilizó como control positivo el ácido ascórbico a 20 μ M y los pretratamientos de los extractos a 25 μ g/mL por 24 h.

Al tratar a las células con glutamato a 12.5 μ M por 30 min, se observó una fluorescencia relativa (con respecto al control con el vehículo) de 0.56 ± 0.02 , por lo que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial fue de un 44%, aproximadamente. El ácido ascórbico (control positivo) presentó una fluorescencia relativa de 0.91 ± 0.02 , por lo que disminuye la pérdida del PMM inducido por el glutamato. Las fluorescencias relativas de los tratamientos con los diferentes extractos fueron, EIPA: 0.89 ± 0.06 , ILR: 0.72 ± 0.09 , MBT: 0.97 ± 0.05 , SAPA: 0.83 ± 0.04 , SAR: 0.83 ± 0.04 y ZCT: 0.82 ± 0.02 , siendo los extractos de EIPA y MBT los que mostraron mayor efecto en la atenuación de PMM (Figura 2.3).

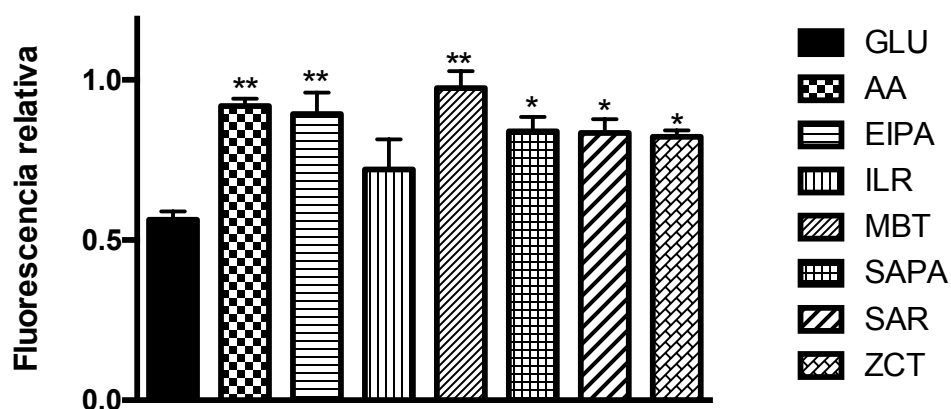


Figura 2.3 Efecto de los extractos en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida por glutamato a 12.5 μ M por 30 min. GLU: Glutamato, AA: Ácido ascórbico, EIPA: Partes aéreas de *Elytraria imbricata*, ILR: Raíces de *Isotoma longiflora*, MBT: Tallos de *Mimosa bahamensis*, SAPA: Partes aéreas de *Schwenckia americana*, SAR: Raíces de *Schwenckia americana* y ZCT: Tallos de *Zanthoxylum caribaeum*. Análisis estadístico: Datos normalizados con respecto al control negativo (sin tratamiento), análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) frente al tratamiento con glutamato, con corrección de Dunnett, $F(7, 24) = 19.11$ $p < 0.0001$. Diferencia significativa *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

2.3.5 Inmunotinciones del cultivo de neuronas corticales

Los cultivos resultaron positivos a células gliales (GFAP) y neuronas (Tuj1), sin embargo, la relación entre estas dos fue baja, evidenciando que las neuronas eran las más abundantes (95%) y no presentaron oligodendrocitos (O4), como se puede observar en la Figura 2.4.

Este tipo de cuantificaciones se realiza para corroborar que el tipo de cultivo es de neuronas, en este caso corticales, y se considera a partir de 90%.

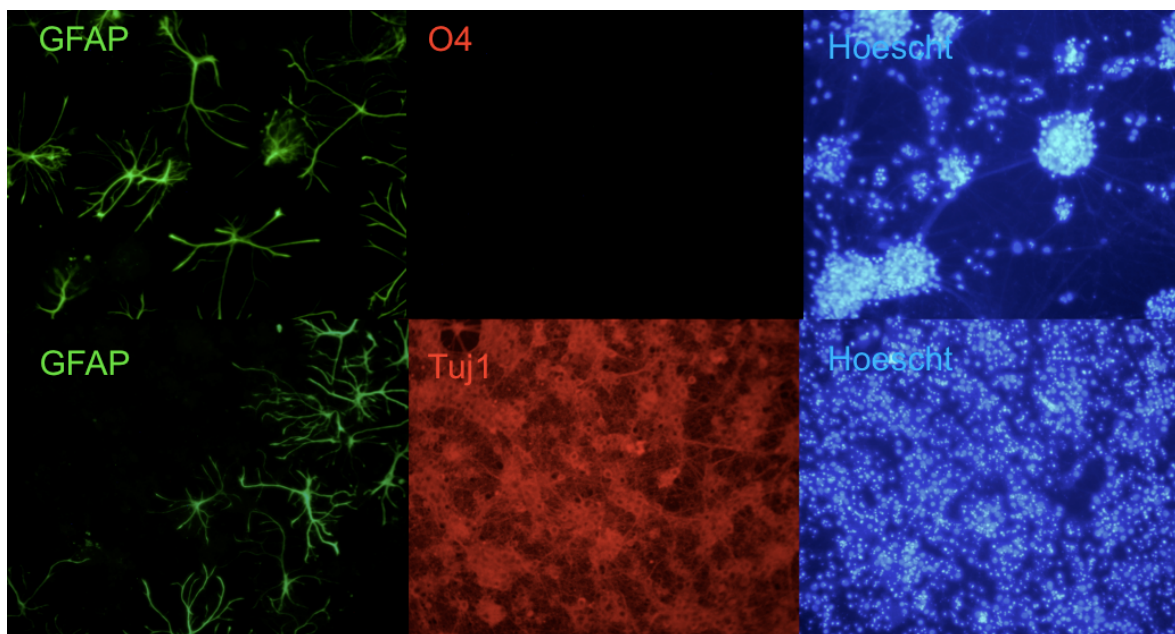


Figura 2.4 Inmunotinción con GFAP, O4 y Tuj1 en cultivo de neuronas corticales de 10 DIV.

2.3.6 Citotoxicidad de los extractos en cultivo de neuronas corticales

En este modelo, los seis extractos no resultaron citotóxicos para las neuronas corticales, es decir que su CC_{50} fue mayor a 125 $\mu\text{g/mL}$.

2.3.7 Efecto neuroprotector de los extractos en cultivo de neuronas corticales contra el daño con glutamato

Los seis extractos resultantes neuroprotectores en el modelo de estrés oxidativo se evaluaron en el modelo de daño con ácido glutámico en neuronas corticales. Se siguió el mismo principio del modelo anterior, en donde se considera que el extracto es activo a una CE_{50} menor o igual a 25 $\mu\text{g/mL}$.

En este modelo de excitotoxicidad se utilizó Dizocilpina (MK-801) como control positivo; esta molécula es un antagonista no competitivo del receptor NMDA y presenta propiedades anestésicas y anticonvulsiantes (Kovacic y Somanathan, 2010).

El porcentaje de viabilidad que presentaron las células tratadas con glutamato (12.5 μM) fue de $47.00 \pm 1.82\%$, es decir, que más del 50% de las neuronas corticales murieron. El

pretratamiento con MK-801 inhibió la mortalidad inducida por glutamato con una CE_{50} de $10.0 \pm 2.4 \mu\text{M}$.

De los seis extractos evaluados en el modelo de estrés oxidativo, tres resultaron con efecto neuroprotector en las neuronas corticales contra el daño inducido por la excitotoxicidad. (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7 Concentración efectiva media (CE_{50}) de los extractos neuroprotectores en el modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato.

Especie	Parte de la especie	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Elytraria imbricata</i>	Partes aéreas	6.8 ± 3.1
<i>Isotoma longiflora</i>	Raíz	12.4 ± 1.8
<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	Tallo	8.6 ± 2.4
MK-801(μM)		10.0 ± 2.4

2.3.8 Perfiles cromatográficos de los extractos con efecto neuroprotector

Se obtuvieron perfiles cromatográficos por medio de HPLC de los seis extractos que resultaron con mayor efecto neuroprotector en el modelo de estrés oxidativo inducido por ácido glutámico. Cada uno de éstos presentó diferentes tiempos de retención (t_R) a diferentes proporciones de disolventes.

Del extracto de partes aéreas de *Elytraria imbricata* (EIPA), disuelto en MeOH:ACN (1:1) a una concentración final de 50,000 ppm, se inyectó 15 μL a un flujo de 1 $\mu\text{L/min}$. El tiempo de corrida fue de 45 min. Los disolventes usados y sus proporciones son mostrados en el Cuadro 2.8. En el cromatograma de EIPA se puede observar un total de 48 picos a 254 nm (Figura 2.5), siendo los que presentan mayor altura y área los que salen a 2.19 min (31.44 mAU, 178.28 mAU*s), 22.83 min (20.31 mAU, 230.04 mAU*s) y 30.32 min (59.06 mAU, 274.27 mAU*s).

Cuadro 2.8 Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de partes aéreas de *E. imbricata*.

Tiempo (min)	Agua con ácido acético al 3% (%)	Acetonitrilo (%)
0	100	0
5	95	5
10	90	10
20	75	25
25	75	25
30	40	60
35	40	60
40	20	80
45	0	100

Del extracto de raíces de *Isotoma longiflora* (ILR), disuelto en MeOH a una concentración final de 50,000 ppm, se inyectó 10 μ L a un flujo de 1 μ L/min. Los disolventes usados y sus proporciones son mostrados en el Cuadro 2.9. En el cromatograma de ILR se puede observar un total de 50 picos a 254 nm (Figura 2.5), siendo los que presentan mayor altura y área los que salen a 2.09 min (126.79 mAU, 820.44 mAU*s), 3.98 min (140.89 mAU, 1643.85 mAU*s) y 20.59 min (117.89 mAU, 848.48 mAU*s).

Cuadro 2.9 Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de raíces de *I. longiflora*.

Tiempo (min)	Agua con ácido acético al 3% (%)	Acetonitrilo (%)
0	95	5
10	90	10
20	70	30
35	40	60
45	20	80

Del extracto de tallos de *Mimosa bahamensis* (MBT), disuelto en MeOH:ACN (1:1) a una concentración final de 50,000 ppm, se inyectaron 25 μ L a un flujo de 1 μ L/min. El tiempo de corrida fue de 50 min. Los disolventes usados y sus proporciones son mostrados en el

Cuadro 2.10. En el cromatograma de MBT se puede observar un total de 42 picos a 274 nm (Figura 2.5), siendo los que presentan mayor altura y área los que salen a 2.21 min (13.33 mAU, 185.47 mAU*s) y 2.36 min (13.69 mAU, 190.37 mAU*s).

Cuadro 2.10 Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de tallos de *M. bahamensis*.

Tiempo (min)	Agua con ácido acético al 3% (%)	Acetonitrilo (%)
0	100	0
5	98	2
10	90	10
20	65	35
25	65	35
30	49	51
40	49	51
45	20	80
50	0	100

Del extracto de partes aéreas de *Schwenckia americana* (SAPA), disuelto en MeOH:ACN (1:1) a una concentración final de 50,000 ppm, se inyectaron 10 µL a un flujo de 1 µL/min. El tiempo de corrida fue de 50 min. Los disolventes usados y sus proporciones son mostrados en el Cuadro 2.11. En el cromatograma de SAPA se puede observar un total de 93 picos a 254 nm (Figura 2.5), siendo los que presentan mayor altura y área los que salen a 17.87 min (7.34 mAU, 736.36 mAU*s), 18.33 min (15.17 mAU, 1521.18 mAU*s) y 19.27 min (9.53 mAU, 956.16 mAU*s).

Cuadro 2.11 Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de partes aéreas de *S. americana*.

Tiempo (min)	Agua con ácido acético al 3% (%)	Acetonitrilo (%)
0	98	2
5	98	2
10	94	6
20	72	28
25	72	28
30	49	51
34	49	51
45	20	80
50	0	100

Del extracto de raíces de *Schwenckia americana* (SAR), disuelto en MeOH:ACN (1:1) a una concentración final de 50,000 ppm, se inyectaron 10 µL a un flujo de 1 µL/min. El tiempo de corrida fue de 50 min. Los disolventes usados y sus proporciones son mostrados en el Cuadro 2.12. En el cromatograma de SAR se puede observar un total de 50 picos a 254 nm (Figura 2.5), siendo los que presentan mayor altura y área los que salen a 22.20 min (5.01 mAU, 80.62 mAU*s), 22.79 min (5.89 mAU, 94.76 mAU*s) y 29.81 min (11.12 mAU, 178.87 mAU*s).

Cuadro 2.12 Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de raíces de *S. americana*.

Tiempo (min)	Agua con ácido acético al 3% (%)	Acetonitrilo (%)
0	98	2
5	98	2
10	94	6
20	72	28
25	72	28
30	49	51
34	49	51
45	20	80
50	0	100

Del extracto de tallos de *Zanthoxylum caribaeum* (ZCT), disuelto en MeOH:ACN (1:1) a una concentración final de 50,000 ppm, se inyectó 10 µL a un flujo de 1 µL/min. El tiempo de corrida fue de 45 min. Los disolventes usados y sus proporciones son mostrados en el Cuadro 2.13. En el cromatograma de ZCT se puede observar un total de 102 picos a 254 nm (Figura 2.5), siendo los que presentan mayor altura y área los que salen a 2.15 min (319.94 mAU, 2360.08 mAU*s), 18.33 min (78.86 mAU, 779.34 mAU*s) y 18.88 min (84.37 mAU, 717.34 mAU*s).

Cuadro 2.13 Disolventes usados y sus proporciones en la corrida cromatográfica del extracto de tallos de *Z. caribaeum*.

Tiempo (min)	Agua con ácido acético al 3% (%)	Acetonitrilo (%)
0	98	2
5	98	2
10	94	6
20	72	28
25	72	28
30	35	56
34	35	56
45	20	80

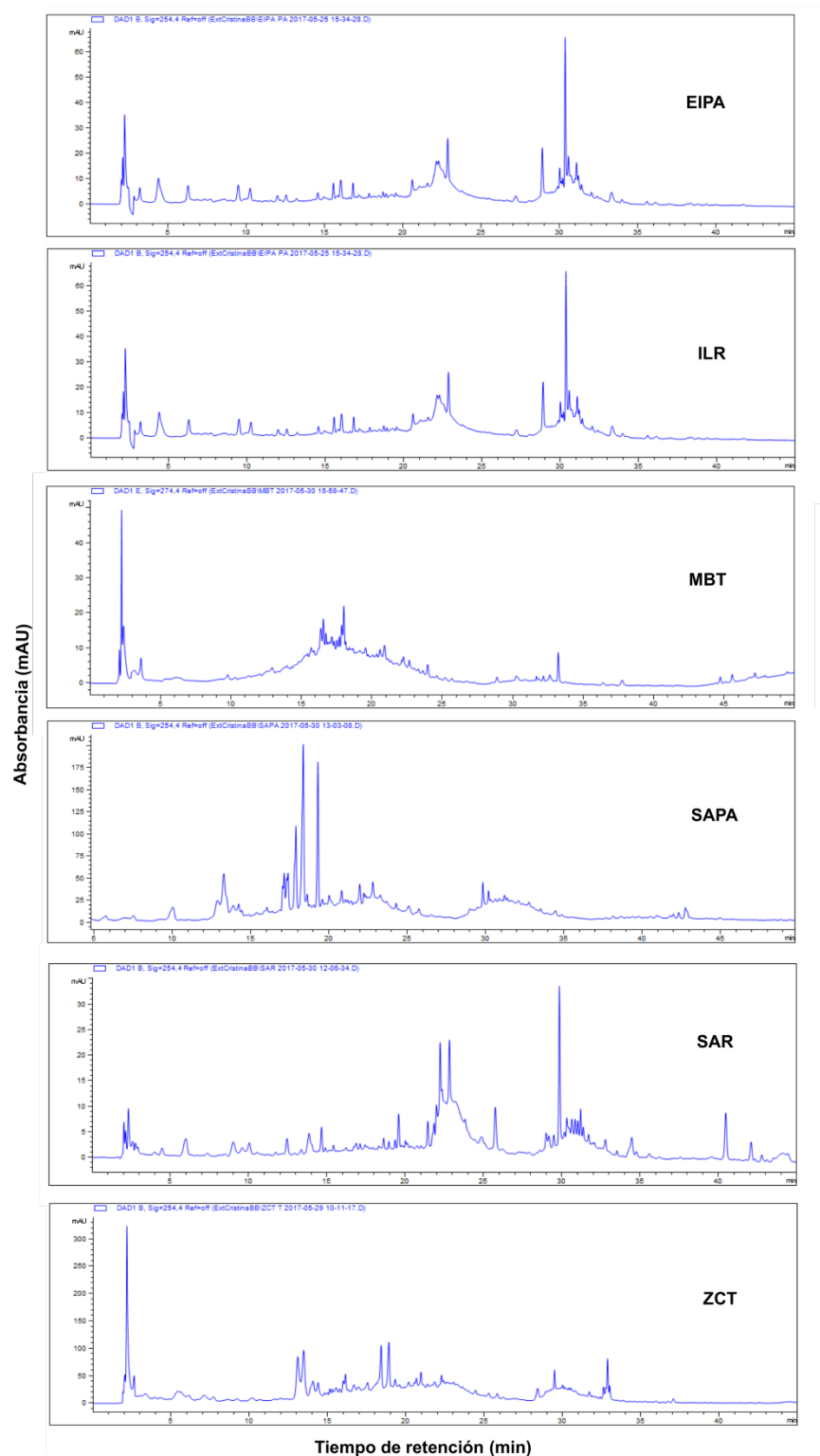


Figura 2.5 Perfiles cromatográficos de los extractos con efecto neuroprotector. EIPA: Partes aéreas de *Elytraria imbricata*, ILR: Raíces de *Isotoma longiflora*, MBT: Tallos de *Mimosa bahamensis*, SAPA: Partes aéreas de *Schwenckia americana*, SAR: Raíces de *Schwenckia americana* y ZCT: Tallos de *Zanthoxylum caribaeum*.

2.4 DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte neuronal progresiva y selectiva. Desafortunadamente, no existen tratamientos que eviten esta muerte neuronal, por lo que es de gran importancia encontrar agentes neuroprotectores, es decir, compuestos, fracciones y/o extractos que tengan el efecto de salvar, recuperar y/o regenerar la estructura y funcionalidad de las neuronas (Vajda, 2002).

En este trabajo se realizó la búsqueda bibliográfica de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes de enfermedades neurológicas. A partir de este listado de especies, se realizó la colecta del material vegetal y se obtuvo el extracto etanólico de cada parte de las plantas. Se decidió utilizar el etanol como disolvente debido a que en la mayoría de las preparaciones utilizadas en la medicina tradicional maya se realizan con etanol o una mezcla de etanol y agua (hidroalcohólicas); además, debido a la polaridad de este disolvente se puede extraer compuestos tanto polares como apolares.

La evaluación del efecto neuroprotector de los extractos etanólicos se realizó en dos modelos, el primero es el de daño inducido por glutamato en la línea celular de neuroblastoma humana SH-SY5Y (modelo de estrés oxidativo), y el segundo modelo fue el de daño inducido por glutamato en cultivo primario de neuronas corticales de rata (modelo de excitotoxicidad).

Antes de evaluar el efecto neuroprotector en estos modelos, se evaluó la citotoxicidad de los extractos en una línea celular normal, en este caso, la línea celular Vero. Esta evaluación se utilizó para descartar los extractos que resultasen citotóxicos a otros tipos de células. El Instituto Nacional de Cáncer considera un extracto como citotóxico cuando presenta una CC_{50} menor a 30 $\mu\text{g/mL}$ (Suffness and Pezzuto, 1990); sin embargo, para aumentar el margen de seguridad del extracto, es decir, reducir el riesgo potencial citotóxico de los extractos, se realizó la curva a partir de la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, siendo el punto medio 125 $\mu\text{g/mL}$, y eligiendo esta concentración como punto de corte. El extracto que presentara una CC_{50} menor a 125 $\mu\text{g/mL}$ no se evaluaría en los siguientes modelos.

Cuatro extractos resultaron citotóxicos en la línea Vero. Existen reportes de actividad citotóxica a nivel género en la línea celular Vero, como es el caso de los géneros *Croton* y

Helicteres. Los extractos de aceites esenciales de las partes aéreas de especies del género *Croton*: *C. ericoides*, *C. pallidulus* y *C. isabelli* fueron evaluados a una concentración de 500 µg/mL, y el porcentaje de citotoxicidad fue de 100, 98 y 98%, respectivamente (Vunda *et al.*, 2012). En otro reporte, el extracto etanólico de las hojas de *C. steenkampianus* presentó una CC₅₀ de 45 µg/mL, atribuyéndose dicha actividad a la presencia de un derivado de indanona, diterpenos y flavonoides (Adelekan *et al.*, 2008). En especies del género *Helicteres* se han aislado compuestos citotóxicos de tipo lignano (pinoresinol, medioresinol, siringaresinol, boehmenan y alcohol *trans*-dihidroconiferilo) y triterpenos de tipo lupano (Chin *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008).

Para la evaluación en el modelo de estrés oxidativo en las células SH-SY5Y, primeramente se evaluó la citotoxicidad en esta línea. Se siguió el mismo criterio que se utilizó en las evaluaciones con las células Vero, resultando 12 extractos citotóxicos y éstos fueron descartados para las siguientes evaluaciones. Existen reportes de actividad citotóxica de especies del mismo género en líneas celulares de cáncer de cerebro (astrocitoma, glioblastoma, neuroblastoma, entre otros), como es el caso de los géneros *Clusia* y *Croton*. Los extractos metanólico, hexánico y de acetato de etilo de *Clusia latipes* mostraron actividad citotóxica (CC₅₀ menor a 30 µg/mL) en líneas celulares cancerígenas astrocitoma humana D384 (Bailón-Moscoso *et al.*, 2016). Los extractos etanólicos de hojas y tallos de especies del género *Croton*: *C. dichrous*, *C. erythroxylodes*, *C. myrianthus* y *C. splendidus* mostraron actividad citotóxica (CC₅₀ menor a 50 µg/mL) en células de glioblastoma humana U-251 MG; dicha actividad fue atribuida a la presencia de lupeol y tilirósido (Savietto *et al.*, 2013).

Para determinar si un extracto mostraba efecto neuroprotector, se realizó una búsqueda bibliográfica de estudios de extractos provenientes de especies vegetales que han sido evaluados en los modelos utilizados en este trabajo. Tomando en cuenta lo anterior se decidió que un extracto es efectivo cuando la CE₅₀ sea menor de 25 µg/mL.

ido a que no se ha establecido una concentración efectiva media (CE₅₀) para determinar si un compuesto o extracto tiene efecto neuroprotector, en este trabajo se consideró, con base en las concentraciones reportadas en la literatura (Cuadro 2.13), que un extracto es efectivo cuando la CE₅₀ sea menor de 25 µg/mL. Tomando en cuenta lo anterior, seis extractos tuvieron un efecto neuroprotector en el modelo de estrés oxidativo: partes

aéreas de *Elytraria imbricata*, raíces de *Isotoma longiflora*, tallo de *Mimosa bahamensis*, partes aéreas y raíces de *Schwenkia americana* y tallos de *Zanthoxylum caribaeum*.

Los seis extractos se evaluaron en bioensayos de citotoxicidad y de efecto neuroprotector en neuronas corticales de rata. Ninguno de los extractos mostró citotoxicidad y tres extractos mostraron efecto neuroprotector en el modelo de excitotoxicidad: partes aéreas de *E. imbricata*, raíces de *I. longiflora* y tallos de *Z. caribaeum*,

Estas especies se escogieron en el presente trabajo porque no existen o se reportan pocos estudios (menos de 10 estudios) fitoquímicos o de efecto neuroprotector, debido a que era uno de los criterios de selección. Sin embargo, se tomaron en cuenta estudios reportados en especies del mismo género para la discusión del presente trabajo.

Elytraria imbricata es reportada en la medicina tradicional maya para tratar dolor de cabeza. No existen reportes de efecto neuroprotector tanto de esta especie como de otras especies del mismo género. Por otro lado, existen reportes de actividad antioxidante, como es el caso de un estudio del extracto hidroalcohólico de la planta completa de *E. acaulis*; su perfil fitoquímico demostró la presencia de glicósidos, flavonoides, fenoles y alcaloides y la actividad antioxidante (inhibición de radicales libres DPPH) presentó un porcentaje de inhibición de 54.43% a 80 µg/mL (Reddy *et al.*, 2015). La actividad antioxidante se podría asociar con el efecto neuroprotector en el modelo de estrés oxidativo en las células SH-SY5Y, sin embargo el extracto de *E. imbricata* no inhibió la generación de EROs intracelular, pero evitó la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, sugiriendo que el mecanismo de inhibición del daño no es por captura de EROs.

Isotoma longiflora es utilizada en la medicina tradicional maya para tratar la depresión. Existen tres reportes de esta especie, el primer reporte es de un perfil fitoquímico realizado al extracto metanólico de hojas, en este se demostró la presencia de saponinas y glicósidos cardíacos (Chichioco-Hernandez y Paguigan, 2010); el segundo reporte trata de la determinación de la actividad antioxidante del extracto metanólico y diclorometánico, tanto de las hojas y tallos, pero ninguno de éstos presentó actividad antioxidante (Cavin *et al.*, 1999); el tercer reporte es sobre el aislamiento de piperidina, lobelina y lobetiolina, compuestos de tipo alcaloide, en partes aéreas y raíz de esta especie (Kesting *et al.*, 2009). En este estudio, el extracto de las raíces de *I. longiflora* fue el que presentó mayor

rendimiento en la extracción (28%) y se demostró que inhibe el daño causado por el estrés oxidativo en las células SH-SY5Y y el daño causado por la excitotoxicidad en las neuronas corticales de rata; sin embargo, no inhibe la generación de EROs y tampoco la pérdida del PMM. Esto podría indicar que el mecanismo para proteger a las neuronas no es directamente sobre la captura de EROs, sino actuando sobre otros blancos como la inhibición de la apoptosis (muerte celular programada).

Mimosa bahamensis es utilizada en la medicina tradicional maya para tratar la epilepsia y el dolor de cabeza. Existen reportes de efecto neuroprotector de una especie del género *Mimosa*: *M. pudica*. El extracto etanólico de la planta completa de esta especie presentó efecto neuroprotector (50 mg/Kg) en un modelo crónico *in vivo* de Alzheimer en ratas inducido con *D*-galactosa y el perfil fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, glicósidos, flavonoides, terpenoides y esteroides (Ittiyavirah y Pullachol, 2014). En otros estudios se reporta actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa del extracto acuoso de raíces a una concentración de 100 µg/mL (Mahanta y Mukherjee, 2001) y actividad anticonvulsionante del extracto acuoso de las hojas en ratas inducidas con pentilentetrazol a una dosis de 100 mg/Kg (Ngo Bum *et al.*, 2004). En relación a la actividad antioxidante, el extracto metanólico de partes aéreas presentó actividad antioxidante a una concentración de 65.2 µg/mL (Thuong *et al.*, 2006). En nuestro estudio, el extracto de tallos de *M. bahamensis* mostró efecto neuroprotector contra el daño causado por el estrés oxidativo, inhibiendo la generación de EROs y evitando la pérdida de PMM, es decir, que tiene capacidad antioxidante, incluso a una menor concentración (25 µg/mL) que *M. pudica*, mostrando el potencial de este extracto.

Schwenkia americana es reportada en la medicina tradicional maya para tratar la depresión. Existe un reporte de actividad antioxidante de los extractos etanólico y acuoso de la planta completa de *S. americana*. Los extractos mostraron actividad antioxidante en ratas a una dosis de 200 mg/Kg; esta actividad se debe al incremento de la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa (Iorliam *et al.*, 2016). En otro estudio realizado previamente por el mismo grupo de trabajo, se determinó el perfil fitoquímico del extracto etanólico y demostraron la presencia de alcaloides, taninos, fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides, esteroides y fitoesteroides (Eriyamremu y Ebehiremen, 2014). En este trabajo, los extractos de las partes aéreas y raíces de *S.*

americana mostraron inhibir la pérdida de PMM, sin embargo, sólo el extracto de las partes aéreas inhibió la generación de EROs significativamente.

Zanthoxylum caribaeum es utilizada en la medicina tradicional maya para tratar la epilepsia y como anestésico. Existen reportes de efecto neuroprotector de especies del género *Zanthoxylum*, como es el caso del extracto metanólico de las raíces de *Z. capense* mostrando efecto neuroprotector a 6.25 µg/mL contra el daño inducido por rotenona en las células SH-SY5Y (Seoposengwe *et al.*, 2013). En otro estudio se reporta el compuesto N-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-3-fenil-acrilamida (gx-50), aislado de *Z. bungeanum* y éste mostró un efecto neuroprotector contra el daño inducido con β-amiloide, así como efecto antiapoptótico (Tang *et al.*, 2013). En este trabajo, *Z. caribaeum* mostró tener efecto neuroprotector en ambos modelos e inhibe la pérdida de PMM en las células SH-SY5Y, pero no la generación de EROs.

Los perfiles cromatográficos es una herramienta útil para obtener información sobre la complejidad y composición química de un extracto o fracción (Rogers *et al.*, 1997). En este trabajo, los seis perfiles cromatográficos de los extractos con efecto neuroprotector. El propósito de haber obtenido los perfiles es para que puedan ser utilizados en futuros trabajos para establecer una huella dactilar cromatográfica, así como para el aislamiento de los metabolitos por medio de la técnica de HPLC.

Adicionalmente a este trabajo, los extractos que mostraron citotoxicidad selectiva a las células de neuroblastoma SH-SY5Y pueden ser un recurso para encontrar compuestos para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de cáncer de cerebro (neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, entre otros).

3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró en la bibliografía 51 especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes a enfermedades neurológicas, de las cuales a 34 especies se le realizaron estudios farmacológicos en dos modelos *in vitro* de daño inducido por glutamato.

Los extractos de *Elytraria imbricata*, *Isotoma longiflora*, *Mimosa bahamensis*, *Schwenckia americana* y *Zanthoxylum caribaeum* tienen efecto neuroprotector en el modelo de estrés oxidativo en células SH-SY5Y, ya que presentaron una CE_{50} igual o menor a 25 $\mu\text{g/mL}$, los cuales, con base en una revisión de la literatura y nuestros criterios de selección, estos extractos se consideran activos.

Los extractos de *Elytraria imbricata*, *Isotoma longiflora* y *Zanthoxylum caribaeum* tienen efecto neuroprotector en el modelo de excitotoxicidad en células neuronales corticales de rata, ya que presentaron una CE_{50} igual o menor a 25 $\mu\text{g/mL}$, los cuales, con base en una revisión de la literatura y nuestros criterios de selección, estos extractos se consideran activos.

De acuerdo con una revisión de la literatura, este es el primer estudio realizado de su tipo, en el cual se utilizaron conocimientos de la medicina tradicional maya para la búsqueda de especies vegetales de la península de Yucatán con efecto neuroprotector.

Con base en los resultados anteriores, se concluye que estos extractos tienen potencial para ser investigados en futuros estudios para el aislamiento de metabolitos con actividad neuroprotectora.

3.2 PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen las siguientes perspectivas.

Colectar mayor cantidad de material vegetal de las especies que mostraron efecto neuroprotector para la obtención de una mayor proporción de extracto y someterlo a

estudios biodirigidos con efecto neuroprotector en la línea celular SH-SY5Y para la búsqueda de compuestos responsables de la actividad biológica.

Obtener perfiles cromatográficos de los extractos de la(s) siguiente(s) colecta(s) de las especies que mostraron efecto neuroprotector para el establecimiento de una huella dactilar cromatográfica, y cerciorarse que el material recolectado contiene el mismo perfil metabólico que el extracto que mostró actividad en el presente estudio.

Adicionalmente, los extractos que resultaron citotóxicos en la línea celular de SH-SY5Y se proponen para estudios de ensayos con actividad anticancerígena, en especial enfocado a cáncer de cerebro (neuroblastoma, astrocitoma, glioblastoma, entre otras).

BIBLIOGRAFIA

- Abramov, A.Y., Scorziello, A., y M.R. Duchen (2007). Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during an oxia and reoxygenation. *Journal of Neuroscience*, 27, 1129-1138.
- Adelekan, A.M., Prozesky, E.A., Hussein, A.A., Ureña, L.D., van Rooyen, P.H., Liles, D.C., Marion Meyer, J.J.M. y B. Rodríguez (2008). Bioactive Diterpenes and Other Constituents of *Croton steenkampianus*. *Journal of Natural Products*, 71, 1919-1922.
- Adibhatlaand, R.M. y R.J.F. Hatcher (2010). Lipid oxidation and peroxidation in CNS Health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12, 125-169.
- Ahlskog, J.E. (2007). I can't get no satisfaction: still no neuroprotection for Parkinson disease. *Neurology*, 69, 1476-1477.
- Arellano-Rodríguez, J., Flores-Guido, J., Tun-Garrido, J. y M. Cruz-Bojórquez (2003). Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México, pp. 312-380.
- Ayala-Peña, S. (2013). Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 102-110.
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J.C., Sordo, M., Villacís, J., Silva, R., Celi, L., Martínez-Vázquez, M. y P. Ostrosky-Wegman (2016). Phytochemical study and evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia latipes* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 44-49
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G. y G. Lenaz (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of ptoron flux through F_0 during ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1606, 137-146.

-
- Barbosa, W.L.R., do Nascimento, M.S., do Nascimento Pinto, L., Maia, F.L.C., Sousa, A.J.A. y J.O.C. Silva Júnior (2012). Selecting Medicinal Plants for Development of Phytomedicine and Use in Primary Health Care, en: Bioactive Compounds in Phytomedicine, Rasooli, I. (ed). InTech. pp. 1-24.
- Barreto, G.E., Santos-Galindo, M. y L.M. Garcia-Segura (2014). Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 132.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. y D. Schubert (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 77, 817-827.
- Berliocchi, L., Bano, D. y P. Nicotera (2005). Ca^{2+} signals and death programmes in neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 2255-2258.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C. y E. Martignoni (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 62, 63-88.
- Brizi, C., Santulli, C., Micucci, M., Budriesim, R., Chiarini, A., Aldinucci, C. y M. Frosini (2016). Neuroprotective effects of *Castanea sativa* Mill. bark extract in human neuroblastoma cells subjected to oxidative stress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 510-520.
- Calon, F., Lavertu, N., Lemieux, A.-M., Morissette, M., Goulet, M., Grondin, R., Blanchet, P. J., Bédard, P. J. y T. Di Paolo (2001). Effect of MPTP-induced denervation on basal ganglia GABA_B receptors: correlation with dopamine concentrations and dopamine transporter. *Synapse*, 40, 225-234.
- Cavin, A., Dyatmyko, W., y K. Hostettmann (1999). Screening of indonesian plants for antifungal and free radical scavenging activities. *Pharmaceutical Biology*, 37, 260-268.
- Cheah, B.C., Vucic, S.; Krishnan, A.V. y M.C. Keirnan (2010). Riluzole, neurprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 1942-1959.

-
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L. y Y. Wang (2010). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, 44, 597-604.
- Chichioco-Hernandez, C.L. y N.D. Paguigan (2010). Phytochemical profile of selected Philippine plants used to treat asthma. *Pharmacognosy Journal*, 2, 198-202.
- Chin, J.H. y N. Vora (2014). The global burden of neurologic diseases. *Neurology*, 83, 349-351.
- Chin, Y.W., Jones, W.P., Rachman, I., Riswan, S., Kardono, L.B.S., Chai, H.B., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Swanson, S.M., Cassady, J. M. y D. Kinghorn (2006). Cytotoxic lignans from the stems of *Helicteres hirsuta* collected in Indonesia. *Phytotherapy Research*, 20, 62-65.
- Compston, A. y A. Coles (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-1517.
- Cui, A.-L., Li, J.-Z., Feng, Z.-B., Ma, G.-L., Gong, L., Li, C.-L., Zhang, C. y Li, K. (2016). Humanin rescues cultured rat cortical neurons from NMDA-induced toxicity not by NMDA receptor. 2014, Article ID 341529.
- Currais, A., Chiruta, C., Goujon-Svrzic, M., Costa, G., Santos, T., Batista M.T., Paiva, J. y M. do Céu Madureira (2014). Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé e Príncipe. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 830-840.
- Darbinyan, A., Kaminski, R., White, M.K., Darbinian, N. y K. Khalili (2013). Isolation and propagation of primary human and rodent embryonic neural progenitor cells and cortical neurons. *Methods of Molecular Biology*, 1078, 45-54.
- Domingues, H.S., Portugal, C.C., Socodato, R. y J.B. Relvas (2016). Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 71.
- Dong, X.X., Wang, Y. y Z.H. Qin (2009). Molecular mechanism of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 379-387.

-
- Eriyamremu, G. y B.E. Iorliam (2014). Biochemical evaluation of ulcer curative effect of ethanolic and aqueous extracts of *Schwenkia americana* Linn on experimental rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3, 125-130.
- Farina, M., Avila, D.S., de Rocha, J.B. y M. Aschner (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, maganese and mercury. *Neurochemistry International*, 62, 575-594.
- Fernandez-Concha, G.C., Tapia Muñoz, J.L., Duno de Setfano, R. y I.M. Ramírez Morillo (2010). Flora ilustrada de la península de Yucatán: listado florístico, CICY, pp. 61-271.
- Geranmayeh, M.H., Baghbanzadeh, A., Barin, A., Salar-Amoli, J., Dehghan, M., Rahbarghazi, R. y H. Azari (2015). Paracrine neuroprotective effects of neural stem cells on glutamate-induced cortical neuronal cell excitotoxicity. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5, 515-521.
- Greenamyre, J.T. y T.G Hastings (2004). Parkinson's—divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 304, 1120-1122.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X. y D. Zhang (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 8, 2003-2014.
- Guo, H.L., Tian, J., Wang, X.S., Tian, Z., Li, X.B., Zhao, M.G. y S.B. Liu (2015). Neuroprotection of sesamin against cerebral ischemia *in-vivo* and N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis *in-vitro*. *Biochemistry & Pharmacology*, 4, 185.
- Hameed, S. y G.Y. Robin-Hsiung (2011). The role of mitochondria in aging, neurodegenerative disease, and future therapeutic options. *British Columbia Medical Journal*, 53, 188-192.
- Hartman, P., Ponder, R., Lo, H.H. y N. Ishii (2004). Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125, 417-420.
- Harvey, A.L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 894-901.

-
- Helton, T.D., Otsuka, T., Lee, M.C., Mu, Y. y M.D. Ehlers (2008). Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 19492-19497.
- Henrich, C.J. y J.A. Beutler (2013). Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. *Natural Products Reports*, 30, 1284–1298.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. y S.R. Robinson (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 57, 417-428.
- Hu, Y., Li, J., Liu, P., Chen, X., Guo, D.H., Li, Q.S. y K. Rahman (2011). Protection of SH-SY5Y neuronal cells from glutamate-induced apoptosis by 3,6'-disinapoyl sucrose, a bioactive compound isolated from *Radix Polygala*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, Article ID 728342.
- Hung, A.Y. y M.A. Schwarzschild (2007). Clinical trials for neuroprotection in Parkinson's disease: overcoming angst and futility?. *Current Opinion in Neurology*, 20, 477-483.
- Iorliam, E.B., Eriyamremu, G. y O.S. Innih (2016). The antioxidant effect and safety assessment of ethanolic and aqueous extracts of *Schwenkia americana* Linn on aspirin induced gastric ulcer in rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7, 59-65.
- Ittiyavirah, S. P. y I. Pullachol (2014). Neuroprotective effect of ethanolic extract of *Mimosa pudica* in D-galactosa induced Alzheimer's model. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 462-470.
- Jang, J.Y., Kinm, H.N., Kim, Y.R., Choi, Y.W., Choi, Y.H., Lee, J.H., Shin, H.K. y B.T. Choi (2013). Hexane extract from *Polygonum multiflorum* attenuates glutamate-induced apoptosis in primary cultured cortical neurons. *Journal of Ethnopharmacology*, 145, 261-268.
- Johri, A., Chandra, A. y M. Flint Beal (2013). PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 37-46.

-
- Kesting, J.R., Tolderlund, I.L., Pedersen, A.F., Witt, Matthias, Jaroszewski, J.W. y D, Staerk (2009). Piperidine and tetrahydropyridine alkaloids from *Lobelia siphilitica* and *Hippobroma longiflora*. *Journal of Natural Products*, 72, 312-315.
- Kich, D.M., Bitencourt, S., Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Pedrosa, R., Laufer, S., Volken de Souza, C.F. y M.I. Goettert (2016). Neuromodulatory effects of *Calyptanthes grandifolia* extracts against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 382-386.
- Kopin, I.J. y S.P. Markey (1988). MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annual Review Neuroscience*, 11, 81-96.
- Kovacic, P. y R. Somanathan (2010). Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801), electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3, 13-22.
- Kritis, A.A., Stamoula, E.G., Paniskaki, K.A. y T.D. Valvilllis (2015). Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontier in Celullar Neuroscience*, 9, 91.
- Lee, D.-S., Ko, W., Kim, D.-C., Kim, Y.-C. y G.-S Jeong (2014). Cudarflavone B provides neuroprotection against glutamate-induced mouse hippocampal HT22 cell damage through the Nrf2 and PI3K/Akt signaling pathways. *Molecules*, 19, 10818-10831.
- Lee, K.Y., Hwang, L., Jeong, E.J., Kim, S.H., Kim, Y.C. y S.H. Sung (2010). Effect of neuroprotective flavonoids of *Agrinomia eupatoria* on glutamate-induced oxidative injury to HT22 hippocampal cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 1704-1706.
- Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W. y A. Frankfurter (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific β -tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 17, 118-132.

-
- Lemus-Mollina, Y., Sánchez-Gómez, M.V., Delgado-Hernández, R. y C. Matute (2009). *Mangifera indica* L. extract attenuates glutamate-induced neurotoxicity on rat cortical neurons. *NeuroToxicology*, 30, 1053-1058.
- Lewerenz, J. y P. Maher, (2015). Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases - What is the evidence?. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 469.
- Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W. y K. Ingkaninan (2008). Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture, *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 112-117.
- Lin, M.T. y M. Flint Beal (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*, 443, 787-795.
- Mahanta, M. y A.K. Mukherjee (2001). Neutralisation of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 55-10.
- Matsuoka, Y., Picciano, M., La Francois, J. y K. Duff (2001). Fibrillar β -amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 104, 609-613.
- Mattson, M. P. y T. Magnus (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 278-294.
- May, J.M. (2012). Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcellular Biochemistry*, 56, 85-103.
- May, J.M., Li, L., Hayslett, K. y Z.-C. Qu (2006). Ascorbate transport and recycling by SH-SY5Y neuroblastoma cells: Response to glutamate toxicity. *Neurochemistry Research*, 31, 785-794.
- McFarland, H.F. y R. Martin (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 8, 913-919.
- Meloni, B.P., Brookes, L.M., Clark, V.W., Cross, J.L., Edwards, A.B., Anderton, R.S., Hopkins, R.M., Hoffman, K. y N.W. Knuckey (2015). Poly-arginine and arginine-

-
- rich peptides are neuroprotective in stroke models. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35, 993-1004.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L. y J.T. Coyle (1989). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2, 1547-1588.
- Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L. y A. Facchini (2001). Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 1131-1135.
- Newman, D.J. y G.M. Cragg (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Ngo Bum, E.N., Dawack, D.L., Schmutz, M., Rakatonirina, A., Rakatonirina, S.V., Portet, C., Jeker, A., Olpe, H.-R. y P. Herrling (2004). Anticonvulsant activity of *Mimosa pudica* decoction. *Fitoterapia*, 75, 309-314.
- Nunome, K., Miyazaki, S., Nakano, M., Iguchi-Ariaga, S. y H. Ariga (2008). Pyrroloquinoline quinone prevents oxidative stress-induced neuronal death probably through changes in oxidative status of DJ-1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 1321-1325.
- Organización mundial de la salud, 2006. Neurological disorders: public health challenges [Online] (actualizado 26 mayo 2017). Disponible en: http://www.who.int/mental_health/neurology/neurodiso/en/ [Acceso en diciembre de 2017].
- Organización Mundial de la Salud, 2000. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2014-2023 [Online], (actualizado 6 diciembre 2017). www.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf [Acceso en diciembre de 2017].
- Osadao, R. (1834). El Libro del judío medicina doméstica, descripción de las virtudes de las yerbas medicinales de Yucatán. Notas adicionales del Dr. Andrew Heath de Zapata, Mérida, Yucatán, México, pp. 20-255.

-
- Pan, M.-H., Chen, C.-M., Lee, S.-W. y Z.-T. Chen (2008). Cytotoxic triterpenoids from the bark root of *Helicteres angustifolia*. *Chemistry & Biodiversity*, 5, 565-574.
- Parameshwaran, K., Dhanasekaran, M. y V. Suppiramaniam (2008). Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Experimental Neurology*, 210, 7-13.
- Patwardhan, B. y R.A. Marhelkar (2009). Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward?. *Drug Discovery Today*, 14, 804-811.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. y G. Sanacora (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 22-37.
- Pregi, N., Vittori, D., Pérez, G., Pérez Leirós, C. y A. Nesse (2006). Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 238-256.
- Prentice, H., Pravinchandra, J. y J.Y. Wu (2015). Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, Article ID 964518.
- Reddy, G.V., Kumar, R.V. y M.K Reddy (2015). Preliminary phytochemical analysis and antioxidant activity of *Elytraria acaulis* plant extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30, 173-176.
- Rogers, J.C., Winkler, L.S y M.F. Borgerding (1997). Chromatographic profiling as a tool in the comparison and evaluation of complex mixtures. *Journal of Chromatographic Science*, 35, 193-200
- Rock, R.B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Cheeran, M., Lokensgard, J.R. y P.K. Peterson (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 942-964.

-
- Rubenstein J.L.R. (2011). Development of the cerebral cortex: implications of neurodevelopmental disorders. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 52, 339-355.
- Saviotto, J.P., Furlan, C.M., Motta, L.B., Salatino, M.L., Carvalho, J.E., Ruiz, A.L.T.G., Salatino, A. y D.Y.A.C. Santos (2013). Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23, 662-667.
- Sayre, L.M., Perry, G. y M.A. Smith (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 172-188.
- Secretaría de Salud, 2015. Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2011 [Online] (Actualizado 25 octubre 2017). Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-y-estadistico-de-la-mortalidad-en-mexico-2011> [Acceso en diciembre 2017].
- Seoposengwe, K., van Tonder, J.J. y V. Steenkamp (2013). *In vitro* neuroprotective potential of four medicinal plants against rotenone induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 353..
- Shi, J.M., Huang, H.J., Qiu, S.X., Feng, S.X. y X.-E. Li (2014). Griffipavixanthone from *Garcinia oblongifolia* Champ. induces cell apoptosis in human non-small-cell lung cancer H520 cells *in vitro*. *Molecules*, 19, 1422-1431.
- Shukla, V., Mishra, S.K. y H.C. Pant (2011). Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Science*, 2011, Article ID 572634.
- Smith, J.L., Xiong, S. y M.A. Lovell (2006). 4-Hydroxynonenal disrupts zinc export in primary rat cortical cells. *NeuroToxicology*, 27, 1-5.
- Suffness, M. y J.M. Pezzuto (1990). Assays related to cancer drug discovery, en: *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, Hostettmann, K. (ed). Academic Press, London, pp. 71-133.
- Sun, P., Ding, H., Liang, M., Li. X., Mo, W., Wang, X., Liu, Y., He, R. y Q. Hua (2014). Neuroprotective effects of geniposide in SH-SY5Y cells and primary hippocampal

neurons exposed to A β 42. Biomedical Research International, 2014, Article ID 284314.

Tang, M., Wang, Z., Zhou, Y., Xu, W., Li, S., Wang, L., Wei, D. y Z. Qiao (2013). A novel drug candidate for Alzheimer's Disease treatment: gx-50 derived from *Zanthoxylum bungeanum*. Journal of Alzheimer's Disease, 34, 203-213.

Taveira, M., Sousa, C., Valentao, P., Ferreres, F., Teixeira, J.P. y P.B. Andrade (2014). Neuroprotective effect of steroidal alkaloids on glutamate-induced toxicity by preserving mitochondrial membrane potential and reducing oxidative stress. Journal of Stereoid Biochemistry & Molecular Biology, 140, 106-115.

Testa, C.M., Sherer, T.B. y J.T. Greenamyre (2005). Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. Molecular Brain Research, 134, 109-118.

Thuong, P.T., Na, M., Dang, N.H., Hung, T. M., Ky, P.T., Thanh, T.V., Nam, N.H., Thuan, N.D., Sok, D. y K. Bae (2006). Antioxidant activities of Vietnamese medicinal plants. Natural Product Science, 12, 29-37.

Tovar-y-Romo L.B., Santa-Cruz, L.D. y R. Tapia (2009). Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Molecular Neurodegeneration, 4, 31.

Vajda, F.J.E. (2002). Neuroprotection and neurodegenerative disease. Journal of Clinical. Neuroscience 9, 4-8.

Vanicha, V. y K. Kirtikara (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature protocol, 1, 1112-1116.

Valverde, F. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. Revisiones en Neurociencia, 34, 758-780.

Vunda, S.L.S., Sauter, I.P., Cibulski, S.P., Roehe, P.M., Bordingnon, S.A.L., Rott, M.B., Apel, M.A. y G.L. von Poser (2012). Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. Parasitology Research, 111, 961-966.

-
- Wang, T.-X., Shi, X.-Y., Cong, Y., Wang, S.-G., Wang Y.-Y. y Z.-Q. Zhang (2013). Reversal of multidrug resistance by 5,5'dimethoxylariciresinol-4-O- β -D-glucoside in doxorubicin-resistant human leukemia K562/DOX. *Indian Journal of Pharmacology*, 45, 597-602.
- Wang, Y. y Z.H. Qin (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, 15, 1382-1402.
- Wang, X., Wang, B., Li, Z., Zhu, G., Heng, L., Zhu, X., Yang, Q., Ma, J. y G. Gao (2016). Neuroprotection effect of Y-27632 against H₂O₂-induced cell apoptosis of primary cultured cortical neurons. *Royal Society of Chemistry Advances*, 6, 49187-49197.
- Weon, J.B., Yang, H.Y., Lee, B., Yun, B.-R., Ahn, J.H., Lee, H.Y. y C.J. Ma (2011). Neuroprotective activity of the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells. *Pharmacognosy Magazine*, 7, 264-288
- Xu, S.-Y., Wu, Y.-M., Ji, Z., Gao, X.-Y. y S.-Y. Pan (2012). A modified technique for culturing primary fetal rat cortical neurons. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, Article ID 803930.
- Yang, E.J., Lee, L.Y., Park, S.H., Lee, P.T. y K.S. Song (2013). Neuroprotective effects of neolignans isolated from Magnoliae Cortex against glutamate-induced apoptotic stimuli in HT22 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 304-312.
- Yew, M.Y., Koh, R.Y., Chye, S.M., Othman, L. y K.Y. Ng (2014). Edible bird's nest ameliorates oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14, 391.
- Yiannopoulou, K.G. y S.G. Papageorgiou (2013). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6, 19-33.
- Zeron, M.M., Chen, N.S., Moshaver, A., Lee, A.T.-C., Wellington, C.L., Hayden, M.R. y L.A. Raymond (2001). Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 17, 41-53.

-
- Zhang, L., Yu, H., Zhao, X., Lin, X., Tan, C., Cao, G. y Z. Wang (2010) Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*, 57, 547-555.
- Zhang, Y. y B.R. Bhavnani (2005). Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release. *BMC Neuroscience*, 6, 1-23.
- Zhou Y. y N.C. Danbolt (2016). Glutamate as neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*, 121, 799-817.
- Zhu, X., Wang, K., Zhang, K., Lin, X., Zhu, L. y F. Zhou (2015). Puerarin protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against glutamate-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 30, 22-28.
- Zwain, I.H. y S.S.C. Yen (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140, 3843-3852.