



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Evaluación del efecto analgésico y antiinflamatorio de *Pereskia sacharosa*
Griseb en modelos murinos e identificación de compuestos bioactivos**

PRESENTA

LBT. FERNANDO RUIZ VELASCO MARTÍNEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUTORES

DRA. YENNY ADRIANA GÓMEZ AGUIRRE

DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO

COMITÉ TUTORAL

DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE BALCH

Aguascalientes, Ags, a 03 de octubre del 2022

Autorizaciones



CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como COTUTORA designada del estudiante **FERNANDO RUIZ VELASCO MARTÍNES** con ID 123524 quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO Y ANTIINFLAMATORIO DE *Pereskia sacharosa* GRISEB EN MODELOS MURINOS E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 31 de mayo de 2021.


Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Tutora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-PO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



Dirección de Investigaciones en Neurociencias

Ciudad de México a 02 de junio de 2021.
Oficio No. DIN-C-00025-2021
Asunto: Voto Aprobatorio

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante FERNANDO RUIZ VELASCO MARTÍNES con ID 123524 quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO Y ANTIINFLAMATORIO DE *Pereskia sacharosa* GRISEB EN MODELOS MURINOS E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 31 de mayo de 2021.

Dra. Edith Sánchez Jaramillo
Tutora de tesis

Callezada México Xochimilco N° 101, Col. San Lorenzo Huipulco, CP. 14370, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México
Tel: (55) 4160 5050 www.inorf.gob.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano Del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio del presente como miembro del Comité Tutorial designado del estudiante **Fernando Ruiz Velasco Martínez**, con ID **123524**, quien realizó la tesis titulada: **Evaluación del efecto analgésico y antiinflamatorio de *Pereskia sacharosa* Griseb en modelos murinos e identificación de compuestos bioactivos**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 31 de mayo de 2021.

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 27-sep-22

NOMBRE: FERNANDO RUIZ VELASCO MARTÍNEZ ID 123524

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA VEGETAL Y ANIMAL

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: Evaluación del efecto analgésico y antiinflamatorio de Pereskia sacharosa Griseb en modelos murinos e identificación de compuestos bioactivos.
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

CONTRIBUYE AL CONOCIMIENTO SOBRE EL EFECTO FARMACOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE Pereskia sacharosa

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE DESCRIPCIÓN:

DRA. ILIANA ERNESTINA RAMÍREZ MEDINA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA JULIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

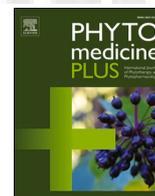
M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Phytomedicine Plus

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/phytomedicine-plus

Antinociceptive activity of *Pereskia sacharosa* Griseb. (Cactaceae) and localization of bioactive compounds in mice brain

Fernando Ruiz-Velasco-Martínez^{a,1}, María Eva González-Trujano^b,
Emmanuel Cabañas-García^c, Nashiely Yáñez-Recendis^d, Eugenio Pérez-Molphe-Balch^a,
Edith Sánchez-Jaramillo^d, Yenny Adriana Gómez-Aguirre^{a,e,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes 20131, México

^b Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo, Huipulco, México, D.F., 14370 México

^c Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 18- Instituto Politécnico Nacional, Blvd. del Bote 202 Cerro del Gato Ejido La Escondida, Col. Ciudad Administrativa Zacatecas, Zacatecas, 98160 México

^d Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo, Huipulco, México, D.F., 14370 México

^e CONACyT Research Fellow-Universidad Autónoma de Aguascalientes - Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes, 20131 México

ARTICLE INFO

Keywords:

Pain relief
Kaempferol
UPLC-MS
Antinociceptive
Pereskia sacharosa

ABSTRACT

Background: *Pereskia sacharosa* Griseb is mainly distributed in the Bolivian Amazon. It is widely used to treat infections and pain in traditional medicine, such as headache, muscle pain, stomachache, and inflammation.

Purpose: This study aimed to evaluate the antinociceptive activity of the leaf ethanolic extract and fractions of *P. sacharosa* that was obtained through micropropagation, possible mechanisms of action, and to identify the main bioactive compound by high liquid chromatography-mass spectrometry, as well as its localization in the brain of mice **by means of histological analysis and epifluorescence**.

Methods: The fractions (C1F9 and C2F13) were isolated from the ethanolic extract of *P. sacharosa* leaves using open column chromatography. The antinociceptive activity of the ethanolic extract (10–100 mg kg⁻¹, intra peritoneal, i.p.) and fractions C1F9 and C2F13 (30 mg kg⁻¹, i.p.) were evaluated in a nociceptive pain model (formalin test) in mice. In addition, a possible mechanism of action was investigated by exploring some inhibitory receptors using naltrexone (NTX, a non-selective opioid receptor antagonist), flumazenil (FMZ, a benzodiazepine site antagonist in the Gamma-aminobutyric acid A [GABA_A] receptor), or WAY100635 (a 5-hydroxytryptamine 1A [5-HT_{1A}] serotonin 1A receptor antagonist).

Results: Regarding the mechanism of action, only antinociceptive activity of treatments in the neurogenic phase of the formalin test was inhibited in the presence of the three explored antagonists. Furthermore, the presence of phenolic compounds was confirmed at the central nervous system (CNS) using their epifluorescence in coronal brain sections and histological analysis. Finally, acid hydrolysis of the ethanolic extract was performed, and it was shown that kaempferol is a product of acid hydrolysis confirmed with a posterior high liquid chromatography-mass spectrometry analysis.

Conclusion: The leaves of *P. sacharosa* contain bioactive metabolites with antinociceptive activity, whereby epifluorescence was an optimum property to detect them at CNS. To the best of our knowledge, this is the first report that provides preclinical evidence of the medicinal use of this species in folk medicine for pain relief.

* Corresponding author.

E-mail addresses: esanchez@imp.edu.mx (E. Sánchez-Jaramillo), yagomez@correo.uaa.mx (Y.A. Gómez-Aguirre).

¹ Taken from the PhD thesis of F. Ruíz-Velasco-Martínez

<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100331>

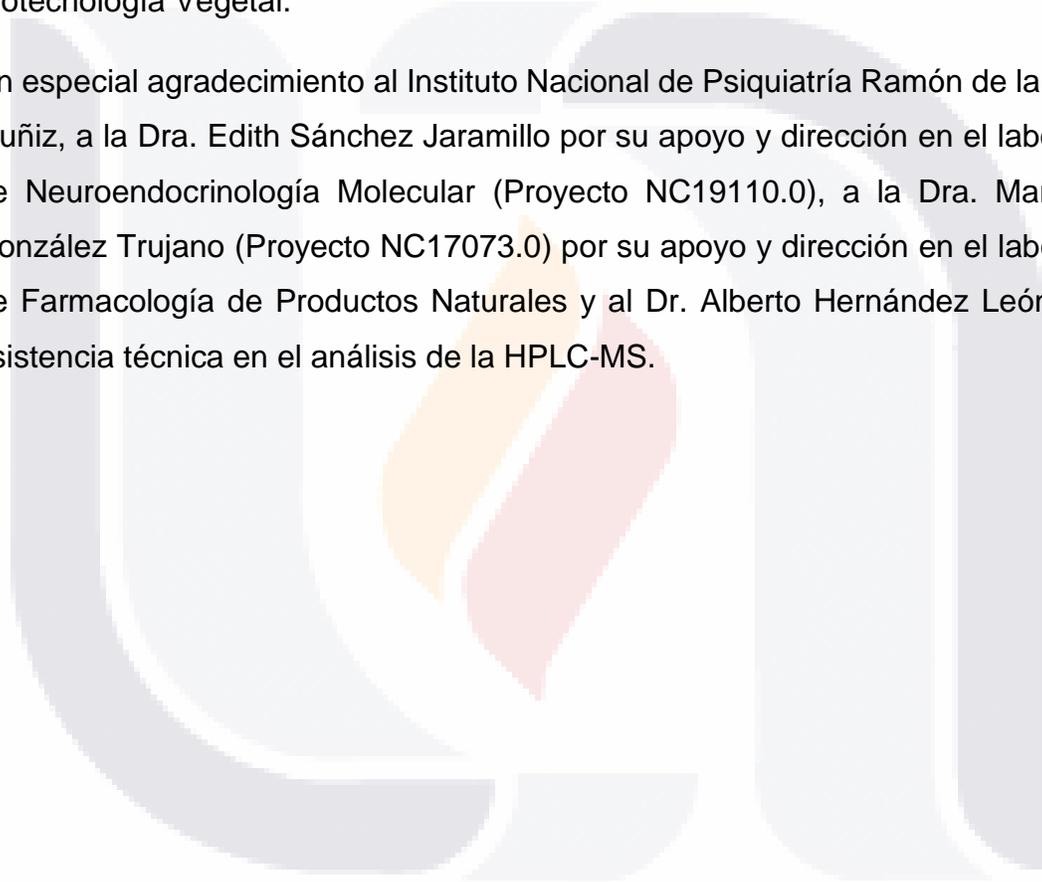
Available online 19 August 2022

2667-0313/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quien financió este proyecto, becas 256448/226454 y 764894, en el programa de posgrado en el Centro de Ciencias Biológicas, Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Agradezco a la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre y al Dr. Eugenio Pérez Molphe Bach por su apoyo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Un especial agradecimiento al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, a la Dra. Edith Sánchez Jaramillo por su apoyo y dirección en el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular (Proyecto NC19110.0), a la Dra. María Eva González Trujano (Proyecto NC17073.0) por su apoyo y dirección en el laboratorio de Farmacología de Productos Naturales y al Dr. Alberto Hernández León por la asistencia técnica en el análisis de la HPLC-MS.



Dedicatorias

Para mi esposa, padres, hermanos, hijo, tutores, asesores, profesores y colegas
que siempre me brindaron su apoyo.



Índice General

| | |
|---|----|
| 1. Introducción..... | 16 |
| 2. Antecedentes | 18 |
| 2.1 Generalidades de la Familia Cactaceae y Género Pereskia... 18 | |
| 2.2 <i>Pereskia sacharosa</i> | 19 |
| 2.3 Etnofarmacología | 21 |
| 2.3.1 Aplicaciones de la Etnofarmacología | 22 |
| 2.4 Etnobotánica | 22 |
| 2.5 Usos Etnobotánicos del Género Pereskia..... | 24 |
| 2.5.1 <i>P. sacharosa</i> | 24 |
| 2.5.2 <i>P. aculeata</i> | 24 |
| 2.5.3 <i>P. bleo</i> | 25 |
| 2.5.4 <i>P. grandifolia</i> | 25 |
| 2.6 Actividad Biológica del Género Pereskia | 25 |
| 2.6.1 <i>P. sacharosa</i> | 25 |
| 2.6.2 <i>P. aculeata</i> | 26 |
| 2.6.3 <i>P. bleo</i> | 26 |
| 2.6.4 <i>P. grandifolia</i> | 27 |
| 2.7 Composición Química del Género Pereskia | 28 |
| 2.7.1 <i>P. sacharosa</i> | 28 |
| 2.7.2 <i>P. aculeata</i> | 29 |
| 2.7.3 <i>P. bleo</i> | 30 |
| 2.7.4 <i>P. grandifolia</i> | 30 |
| 2.8 Cultivo <i>In vitro</i> de Tejidos Vegetales | 32 |
| 2.8.1 Cultivos de Tejidos del Género Pereskia | 32 |
| 2.9 Nocicepción | 34 |
| 2.10 Actividad Nociceptiva | 35 |
| 2.11 Cascada de Señalización Nociceptiva | 36 |
| 2.12 Efectos Generados por la Nocicepción | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.12.1 Dolor | 37 |
| 2.12.2 Inflamación | 39 |
| 2.13 Lipopolisacárido de <i>E. coli</i> | 40 |
| 2.13.1 Estructura del LPS | 41 |
| 2.13.2 Mecanismo de Acción de LPS | 42 |
| 2.14 Síntesis de Interleucina-6..... | 43 |
| 2.15 Modelos Murinos..... | 44 |
| 2.15.1 Cepa C57/BL6/JN | 45 |
| 2.15.2 Cepa CD1 | 45 |
| 2.16 Fisiología del Eje Tiroideo | 46 |
| 2.16.1 Hormonas Tiroideas..... | 46 |
| 2.16.2 Tirotropina..... | 46 |
| 2.16.3 Hormona Liberadora de Tirotropina TRH..... | 47 |
| 2.17 Fisiología del Eje Adrenal | 49 |
| 2.17.1 Corticotropina ACTH..... | 49 |
| 2.17.2 Hormona Liberadora de Corticotropina, CRH | 49 |
| 3. Justificación..... | 51 |
| 4. Hipótesis | 53 |
| 5. Objetivos | 54 |
| 5.1 Objetivo General | 54 |
| 5.2 Objetivos Particulares | 54 |
| 6. Metodología..... | 55 |
| 6.1 Micropropagación..... | 55 |
| 6.2 Adaptación y Transferencia a Suelo de las Plantas Generadas <i>In vitro</i> | 55 |
| 6.3 Recolección de Hojas | 56 |
| 6.4 Procesamiento de Extractos | 56 |
| 6.5 Cuantificación de Compuesto Fenólicos | 57 |
| 6.6 Cuantificación de Flavonoides | 57 |
| 6.7 Separación de Compuestos Mayoritarios Mediante Cromatografía en Columna Abierta..... | 58 |

| | |
|--|----|
| 6.7.1 Fraccionamiento 1, Extracto Etanólico Total..... | 58 |
| 6.7.2 Fraccionamiento 2, Extracto Etanólico Total..... | 59 |
| 6.7.3 Fraccionamiento 3 Sección C2F8..... | 59 |
| 6.7.4 Fraccionamiento 4 Sección C2F9..... | 60 |
| 6.7.5 Fraccionamiento 5 Sección C2F15..... | 60 |
| 6.7.6 Fraccionamiento 6 Sección C2F8, C2F9, C3F5..... | 61 |
| 6.7.7 Fraccionamiento 7 Sección C6F12..... | 61 |
| 6.8 Análisis Cromatográfico..... | 62 |
| 6.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Masas HPLC-MS | 62 |
| 6.10 Ensayo Biológico de Actividad Antinociceptiva..... | 63 |
| 6.11 Análisis Estadístico de Actividad Antinociceptiva..... | 64 |
| 6.12 Ensayo Biológico de Lipopolisacárido de <i>E. coli</i> | 65 |
| 6.12.1 Animales..... | 65 |
| 6.13 Ensayo LPS CD1..... | 65 |
| 6.14 Ensayo LPS C57/BL6/JN..... | 66 |
| 6.15 Análisis Histológico..... | 66 |
| 6.15.1 Cepa CD1..... | 66 |
| 6.15.2 Cepa C57/BL6/JN..... | 67 |
| 6.16 Inmunoensayo ELISA para Corticosterona..... | 67 |
| 6.17 Inmunoensayo ELISA para Inteleucina-6..... | 67 |
| 6.18 Análisis Estadístico de Inmunoensayos ELISA..... | 68 |
| 6.19 Análisis Microscópico de Epifluorescencia y Microscopía Confocal | 68 |
| 6.20 Hibridación de ARN..... | 69 |
| 6.20.1 Linearización de Plásmidos de Ratón TRH, CRH y D2..... | 69 |
| 6.20.2 Purificación de Plásmidos..... | 70 |
| 6.20.3 Electroforesis de Plásmidos mCRH, mTRH, mD2 Purificados..... | 71 |
| 6.20.4 Transcripción <i>In vitro</i> mD2/NcoI y mCRH/HindIII rUTPdig-11..... | 73 |
| 6.20.5 Fijación Tejido Congelado D2, CRH y TRH..... | 74 |
| 6.20.6 Mezcla de Hibridación..... | 75 |
| 6.20.7 Hibridación <i>In situ</i> | 75 |

| | |
|--|-----|
| 6.20.8 Lavados Post Hibridación D2 (n=16), CRH (n=16) y TRH (n=33)..... | 76 |
| 6.20.9 Incubación con Anticuerpo Ab POD..... | 77 |
| 6.20.10 Revelado de Láminas Dig Tiramida-DMSO-Alexa 488 (Kit mp 20913, Invitrogen)..... | 77 |
| 7. Resultados | 78 |
| 7.1 Micropropagación..... | 78 |
| 7.2 Aclimatación y Establecimiento de Plantas a la Intemperie | 78 |
| 7.3 Procesamiento de Extractos | 81 |
| 7.4 Cromatografía en Capa Fina de Extractos Totales | 82 |
| 7.5 Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides | 82 |
| 7.6 Separación de Compuestos Mayoritarios | 84 |
| 7.6.1 Fraccionamiento 1 | 84 |
| 7.6.2 Fraccionamiento 2 | 88 |
| 7.6.3 Fraccionamiento 3 (C2F8) | 91 |
| 7.6.4 Fraccionamiento 4 (C2F9) | 93 |
| 7.6.5 Fraccionamiento 5 (C2F15) | 95 |
| 7.6.6 Fraccionamiento 6 (C2F8, C2F9, C3F5)..... | 98 |
| 7.6.7 Fraccionamiento 7 (C6F12 Fase Reversa) | 100 |
| 7.7 Cromatografía Líquida de Alta resolución Acoplado a Masas HPLC-MS | 102 |
| 7.8 Actividad Antinociceptiva | 105 |
| 7.9 Cuantificación de Corticosterona | 111 |
| 7.10 Cuantificación de Interleucina-6..... | 112 |
| 7.11 Análisis Microscópico de Epifluorescencia y Microscopía Confocal | 113 |
| 8. Discusión..... | 117 |
| 8.1 Micropropagación..... | 117 |
| 8.2 Aclimatación..... | 118 |
| 8.3 Procesamiento de Extractos | 120 |
| 8.4 Cromatografía en Capa Fina y Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides..... | 121 |
| 8.5 Fraccionamientos..... | 122 |

8.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Masas HPLC-MS 124

8.7 Actividad Antinociceptiva 127

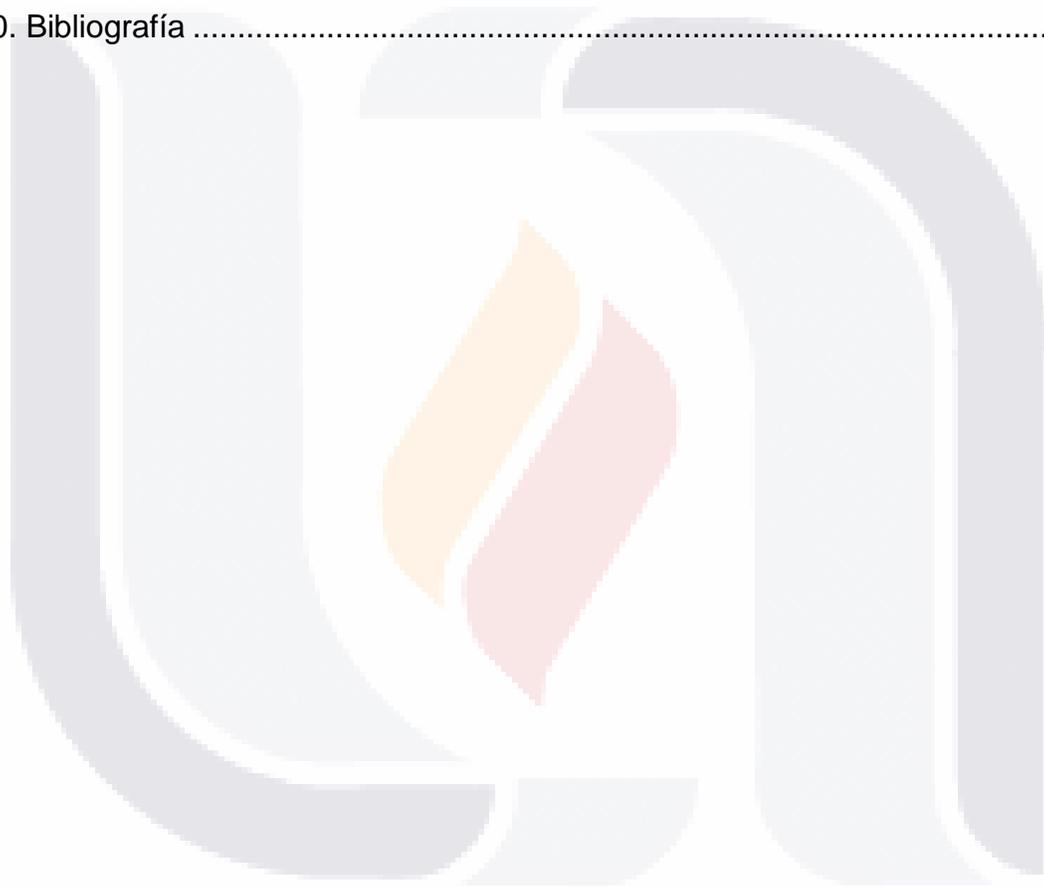
8.8 Inmunoensayos ELISA..... 135

8.9 Análisis Microscópico de Epifluorescencia y Microscopía Confocal 139

8.10 Hibridación *In situ*..... 141

9. Conclusiones.....143

10. Bibliografía147



Índice de Tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Metabolitos Secundarios en Género <i>Pereskia</i> | 31 |
| Tabla 2. Mezcla de Reacción para Linearización de Plásmidos con sus Respectivas Enzimas de Restricción y Buffer. | 69 |
| Tabla 3. Mezcla de Reacción para Electroforesis de ADN Purificado y Linearizado. | 72 |
| Tabla 4. Coctel de Reacción para Transcripción <i>in vitro</i> de ARNm de D2, CRH y TRH. | 73 |
| Tabla 5. Coctel de Hibridación <i>In situ</i> | 75 |
| Tabla 6: Resultados de Micropropagación y Propagación Mediante Esquejes | 80 |
| Tabla 7. Rendimiento de Extractos Procesados de Hojas de <i>P. sacharosa</i> | 81 |
| Tabla 8. Fracciones Individuales Aisladas, Fraccionamiento 1..... | 84 |
| Tabla 9. Fracciones Individuales Aisladas, Fraccionamiento 2..... | 88 |
| Tabla 10. Purificación de la Fracción C2F8, Fraccionamiento 3..... | 91 |
| Tabla 11. Purificación de la Fracción C2F9, Fraccionamiento 4..... | 93 |
| Tabla 12. Purificación de la Fracción C2F15, Fraccionamiento 5..... | 95 |
| Tabla 13. Purificación de las Fracciones C2F8, C2F9 y C3F5, Fraccionamiento 6. | 98 |
| Tabla 14. Purificación de la Fracción C6F12, Fraccionamiento 7..... | 100 |

Índice de Figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides | 48 |
| Figura 2. Regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal | 50 |
| Figura 3. Brotación y Enraizamiento..... | 78 |
| Figura 4. Adaptación y Propagación..... | 79 |
| Figura 5. Separación de Flavonoides por Cromatografía en Capa Fina de Extracto de Hojas de <i>P. sacharosa</i> | 82 |
| Figura 6. Curva de Calibración de Ácido Gálico..... | 83 |
| Figura 7. Curva de Calibración de Quercetina | 83 |
| Figura 8. Análisis de Fracciones por Cromatografía en Fase Normal..... | 85 |
| Figura 9. Cromatografías FN y FR, Fraccionamiento | 87 |
| Figura 10. Cromatografías en Capa Fina de Fase Normal (FN), Fraccionamiento 2 | 90 |
| Figura 11. Análisis de la Fracción C3F5 Mediante Cromatografía en Fase Normal del Fraccionamiento C2F8 | 92 |
| Figura 12. Cromatografía en Fase Normal, Fracción C2F9 Posterior a Sub-Fraccionamiento C2F9 | 94 |
| Figura 13. Cromatografía en Fase Normal de las Fracciones C2F9 y C2F15 | 97 |
| Figura 14. Cromatografía en Fase Normal de Mezcla de Fracciones (C2F8, C2F9, C3F5) | 99 |
| Figura 15. Cromatografía en Fase Reversa de la Fracción C6F12..... | 101 |
| Figura 16. Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplado a Masas | 103 |
| Figura 17. Cromatografía Líquida de Alta Resolución para de las Fracciones aisladas C1F6 y C1F9..... | 104 |
| Figura 18. Evaluación de la Actividad Antinociceptiva del Extracto Etanólico de <i>P. sacharosa</i> en Ratones de la Cepa CD1 | 106 |

Figura 19. Evaluación de la Actividad Antinociceptiva del Extracto Etanólico y de las Fracciones Aisladas, en Ratones de la cepa CD1 108

Figura 20. Evaluación de Actividad Antinociceptiva de Estándares y Entagonistas, en Ratones de la Cepa CD1 110

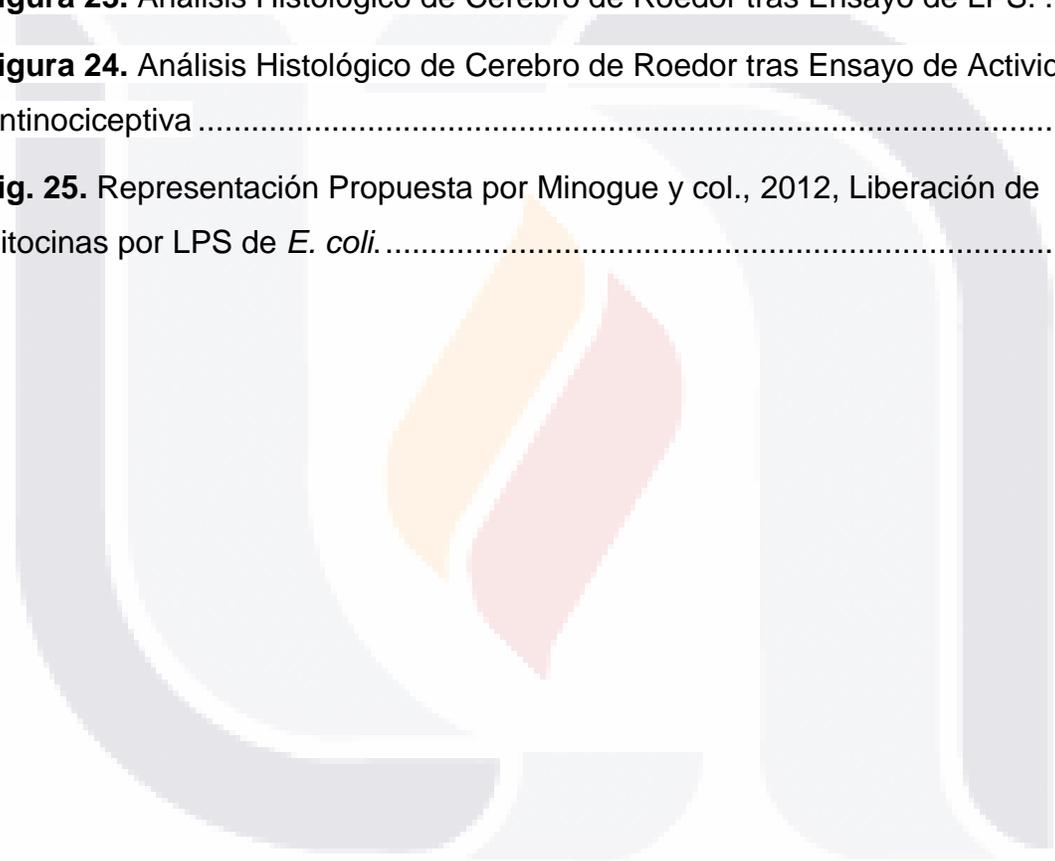
Figura 21. Cuantificación de Corticosterona en Sangre 111

Figura 22. Cuantificación de Interleucina-6 (IL-6) en Sangre 112

Figura 23. Análisis Histológico de Cerebro de Roedor tras Ensayo de LPS. 114

Figura 24. Análisis Histológico de Cerebro de Roedor tras Ensayo de Actividad Antinociceptiva 116

Fig. 25. Representación Propuesta por Minogue y col., 2012, Liberación de Citocinas por LPS de *E. coli*. 138



Acrónimos

ACTH: Hormona adrenocorticotropa o corticotropina

AIA: Ácido Indol-3-acético

AIB: Acido indol-3-butírico

Arc: Núcleo arcuato hipotalámico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BA: 6-Bencilaminopurina

BDZ: Benzodiazepinas

C-3-G: Canferol-3-glycosido

C57: Ratones cepa C57/BL6/JN

CD1: Ratones cepa CD1

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol)

DI, DII, DIII: Enzimas desyodasas I, II, III

FLUMZ: Flumazenil

FN: Fase normal

FR: Fase reversa

GABA_A: Ácido gamma amino butírico

gr: Gramo

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HPLC-MS: Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a masas

Icta: Arteria carótida interna

IIIIV: Tercer ventrículo

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

kg: Kilogramo

L: Litro

LPS: Lipopolisacárido de *E. coli*

m/v: Masa/Volumen

mg L⁻¹: Miligramo por mililitro

mg mL⁻¹: Miligramo por micro litro

mg/L: Miligramo por litro

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mL⁻¹: Micro litro

mm: Milímetros

MS: Medio de cultivo Murashige & Skoog

N: Normal

ng: Nano gramo

NLTX: Naltrexona

nm: Nanómetros

NP: Difenilboriloxietilamina

PEG: Poli etilenglicol etanólico

pg: Pico gramo

Picloram: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-metilico

Rf: Factor de retención

rpm: Revoluciones por minuto

SNC: Sistema nervioso central

T3: Triyodotironina

T4: Tiroxina

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRH: Hormona liberadora de tirotropina

TSH: Tirotropina

ug mL⁻¹: Microgramo por micro litro

ug: Microgramo

uL: micro litro

uM: Micro molar

UV: Ultravioleta

WAY: WAY-100635

Resumen

Pereskia sacharosa Griseb se distribuye principalmente en la Amazonía boliviana; en la medicina tradicional es empleada para tratar infecciones fúngicas, dolor de cabeza, inflamación, dolor muscular, diarrea, fiebre, disentería, irritación de la piel y dolor de estómago. El objetivo del estudio fue desarrollar un protocolo utilizando micropropagación *in vitro* de *P. sacharosa* para aislar e identificar metabolitos bioactivos en las hojas de plantas aclimatadas y cultivadas en suelo de invernadero y exteriores. Empleando extracto etanólico y los compuestos purificados del mismo extracto, se realizó una evaluación de la actividad antinociceptiva y se exploró el mecanismo de acción en diferentes receptores inhibitorios, mediante la administración conjunta del extracto etanólico con naltrexona (antagonista opiode no selectivo), flumazenil (antagonista del receptor a benzodiazepinas / GABAA) o WAY100635 (5-HT1A / antagonista del receptor a serotonina). Adicionalmente se analizó la respuesta inmune en ratones CD1 o C57/BL6/JN expuestos a una dosis de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, administrado en conjunto con el extracto etanólico de *P. sacharosa*, mediante la cuantificación de corticosterona e interleucina 6 (IL-6) en sangre tras 3 y 9 horas de exposición.

Nuestros resultados mostraron que las tasas de micropropagación fueron de 7 ± 0.64 brotes/segmento nodal usando 6-bencilaminopurina y 6 ± 0.587 raíces/segmento nodal usando ácido indol-3-butírico, con una supervivencia del 100% tanto en invernadero como a la intemperie. El aislamiento de compuestos fenólicos del extracto etanólico se realizó mediante cromatografía en columna abierta en fase normal y reversa, empleando un gradiente de solventes polares y apolares. Posteriormente mediante el análisis fitoquímico en HPLC-MS, en conjunto con el hidrolisis acida, se demostró la presencia de canferol, y mediante la evaluación farmacológica de la actividad antinociceptiva del extracto etanólico en varias dosis (10-100 mg/kg, i.p.), se demostró un efecto significativo al disminuir el comportamiento de sacudidas y lamidas en ratones de la cepa CD1 en dosis de 30 y 100 mg/kg, i.p. del extracto. Las fracciones C1F6, C1F9 y C4F13 mostraron

efectos significativos en ambas conductas a una dosis de 30 mg/kg, donde la fracción C4F13 inhibió completamente la nocicepción. La administración en conjunto del extracto etanólico con antagonistas de receptores a opioides, gabaérgicos o serotoninérgicos, no modificó el efecto antinociceptivo del extracto de hoja de *P. sacharosa* en la prueba de formalina, por lo que concluimos que el mecanismo de acción de esta planta es independiente de los mecanismos de acción de estas vías. La administración de LPS en conjunto con el extracto etanólico de *P. sacharosa* logró disminuir la concentración de corticosterona en sangre, pero no IL-6, tras 3 y 9 horas de exposición en ambas cepas, siendo la cepa CD1 la más receptiva. Se propone que la actividad antinociceptiva y el efecto analgésico de esta planta son generados en parte por los compuestos fenólicos, entre ellos el canferol, el cual podría inhibir la síntesis de citocinas inflamatorias, además dichos compuestos fenólicos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica del cerebro.

En conclusión, *P. sacharosa* no mostró participación en la modulación de la actividad de receptores nociceptivos a nivel central. Proponemos que el efecto analgésico de esta planta es generado por la presencia de compuestos fenólicos como el canferol y sus derivados, lo cual sustenta de manera científica las aplicaciones de esta especie en la medicina tradicional

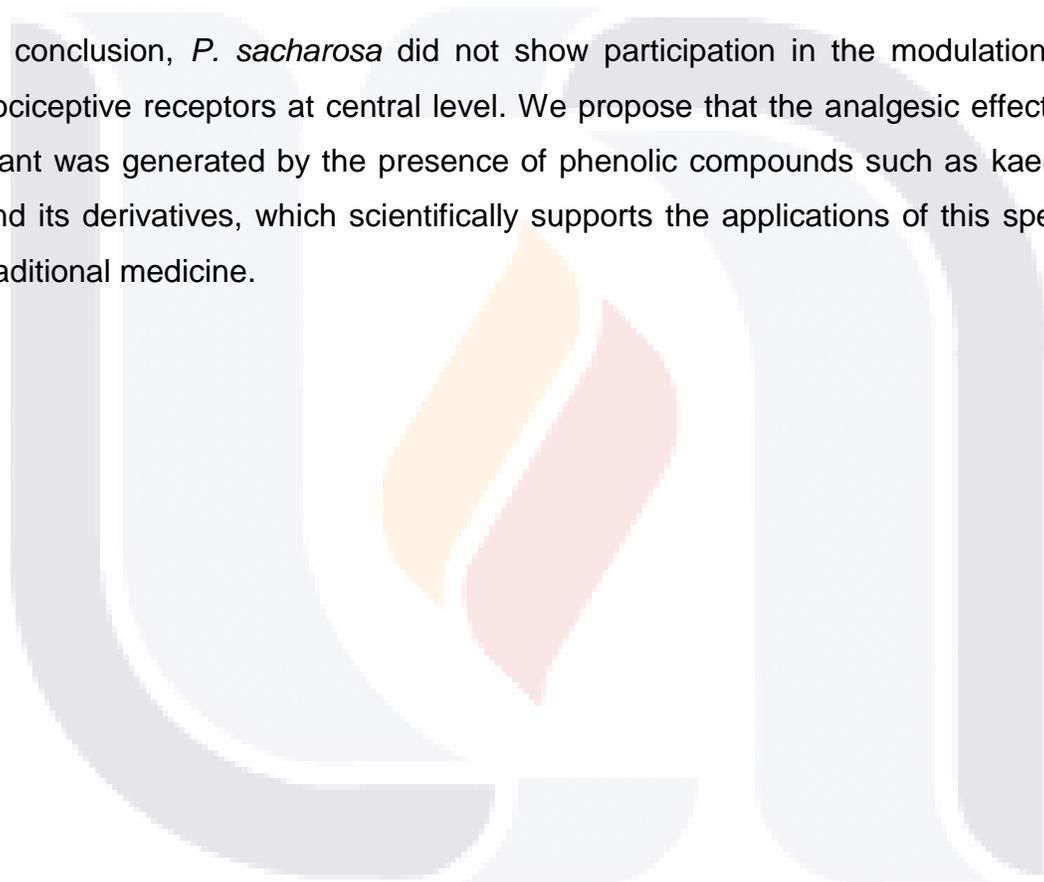
Abstract

Pereskia sacharosa Griseb is mainly distributed in the Bolivian Amazon, in traditional medicine; it was used to treat fungal infections, headache, inflammation, muscle pain, diarrhea, fever, dysentery, skin irritation, and stomachache. The aim of the study was to develop a protocol using *in vitro* micropropagation of *P. sacharosa* to isolate and to identify bioactive metabolites from leaves of samples from plants acclimatized and cultivated in greenhouse and outdoor soils. Using ethanolic extract and purified compounds, was performed the antinociceptive activity in the formalin test, and the mechanism of action was also explored in different inhibitory receptors by coadministration of the extract plus naltrexone (non-selective opioid antagonist), flumazenil (receptor antagonist of benzodiazepines/GABAA) or WAY100635 (5-HT1A/serotonin receptor antagonist) was carried out. In other hand, the LPS test was carried out in joint administration with ethanolic extract, the corticosterone and interleukin 6 in blood was quantified after 3 and 9 hours of exposure.

Our results showed that the micropropagation rates were 7 ± 0.64 shoots/nodal segment using 6-benzylaminopurine and 6 ± 0.587 roots/nodal segment using indole-3-butyric acid, with 100% survival rate in greenhouse and outdoor. Isolation of phenolic compounds from ethanolic extract was performed by open column chromatography in normal and reverse phase, using gradient polar and non polar solvents. Subsequently, through the phytochemical HPLC-MS analysis performed with acid hydrolysis, showed kaempferol and derivatives presence. The pharmacological evaluation of the antinociceptive activity of the ethanol extract at several doses (10-100 mg/kg, i.p.) and the individual isolated fractions demonstrated significant activity by decreasing shaking and licking behavior in mice at doses of 30 and 100 mg/kg, i.p. of the extract. Meanwhile, fractions C1F6, C1F9 and C4F13 showed significant effects at a dosage of 30 mg/kg, where fraction C2F13 completely inhibited nociception. Co-administration of the isolated compound of *P. sacharosa* extract with opioid, GABAergic and serotonergic antagonist receptors did not modify the antinociceptive in formalin test; therefore, the mechanisms of action of this plant

are not at the level of the central nervous system. While the LPS test together with the ethanolic extract reduced the concentration in blood of corticosterone, but not the IL-6; after 3 and 9 hours of exposure, in both strains. Being the CD1 strain the most sensitive, this test corroborated the antinociceptive activity and analgesic effect of phenolic compounds, specifically kaempferol, which was proposed as an inhibitor of the synthesis of inflammatory cytokines. Furthermore, these phenolic compounds can cross the blood-brain barrier.

In conclusion, *P. sacharosa* did not show participation in the modulation of the nociceptive receptors at central level. We propose that the analgesic effect of this plant was generated by the presence of phenolic compounds such as kaempferol and its derivatives, which scientifically supports the applications of this species in traditional medicine.



1. Introducción

A lo largo de la historia las plantas medicinales han acompañado al hombre, y el conocimiento de estas se ha enriquecido durante siglos gracias a la observación y paciencia de los pueblos que han buscado apropiarse de la fuerza curativa de estas. La herbolaria ha sido un recurso importante para buscar el alivio contra el padecimiento de afecciones comunes, plasmando dicho conocimiento en códices, tratados o incluso transmitiéndose de manera empírica de generación en generación (García, 2007). El estudio contextualizado del uso de las plantas y las correlaciones hombre-planta, ha involucrado la dinámica natural y social de los agro ecosistemas con relación a las funciones que las plantas desempeñan en una cultura (Alarcón, 2001).

De acuerdo a la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Bermúdez y col., 2005).

Pereskia sacharosa es un árbol ligeramente suculento que tiene hojas sustanciales y espinas que derivan de las areolas, presenta tallos delgados que pueden alcanzar de 2 hasta 8 metros de altura (Edwards y col., 2005). Es originaria de América del Sur, y se encuentra principalmente distribuida en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Bolivia (Hunt y col. 2006). Sus propiedades medicinales son comúnmente empleadas y reportadas por etnias asentadas en la Amazonia Boliviana en la región de Chaco, mostrando similitud interétnica entre los pueblos Weenhayek e Izoceño-guaraní. De donde deriva el mayor conocimiento tradicional sobre el uso de *P. sacharosa*, la cual es conocida popularmente como Huuyúk y Guayapa, donde su principal aplicación en ambos pueblos es debido a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Quiroga & Arrázola, 2013; Vaera y col., 2002).

Mediante diferentes estrategias de cultivo implementadas en base al uso de la biotecnología vegetal, se ofrece una alternativa partiendo de la micropropagación para obtener la mayor cantidad de biomasa, con la finalidad de procesar y obtener extractos totales enriquecidos con compuestos fenólicos, a los cuales se les ha atribuido sus propiedades medicinales en otras especies de la misma familia. Se plantea la identificación de los componentes farmacológicamente bioactivos mediante técnicas analíticas, el escalamiento de la actividad antinociceptiva y la exposición a lipopolisacárido de *E. coli* en modelos murinos.



2. Antecedentes

2.1 Generalidades de la Familia Cactaceae y Género Pereskia

Las cactáceas son plantas del desierto ampliamente reconocidas por su forma de crecimiento y su especializada condición ausente de hojas. Esta familia de dicotiledóneas pertenecientes al orden Caryophyllales es representada por 4 subfamilias, 124 géneros y existen de 1500 a 1800 especies que reúnen adaptaciones fisiológicas y morfológicas a la sequía. A pesar de que se encuentran en una variedad de entornos, estas plantas son componentes esenciales de las regiones áridas y ambientes cálidos. La mayoría de la diversidad de las cactáceas se encuentra dentro de dos subfamilias principales: Opuntioideae y Cactoideae, los cuales presentan tallos suculentos con hojas vestigiales, corteza de tallo fotosintético, metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) para obtener su fuente de carbono, células especializadas que ayudan al almacenamiento de agua, ovarios inferiores, brotes cortos especializados con entrenudos reducidos que producen espinas y flores. Existen otras dos subfamilias pequeñas denominados Pereskia y Maihuenia, que se encontraban unidas en una tercera subfamilia Pereskioideae únicamente por la ausencia compartida de muchos rasgos presentes en los cactus típicos, sin embargo, Maihuenia se separó de Pereskia colocándose en su propia subfamilia (Edwards y col., 2005).

El género Pereskia consta de 25 especies: *P. aculeata*, *P. aureiflora*, *P. bahiensis*, *P. bleo*, *P. corrugata*, *P. cubensis*, *P. diaz-romeroana*, *P. godseffiana*, *P. grandifolia*, *P. grandiflora*, *P. guamacho*, *P. horrida*, *P. humboldtii*, *P. lychnidiflora*, *P. marcanoii*, *P. nemorosa*, *P. portulacifolia*, *P. quisqueyana*, *P. sacharosa*, *P. stenantha*, *P. vargasii*, *P. weberiana*, *P. zehntneri*, *P. zinniiflora* y *P. zinniaefolia*, (de Castro y Scio, 2014). Estas especies del género Pereskia son denominados cactus relictos y son empleados como modelos generales de la condición ancestral que permitió la generación de la morfología altamente especializada y la fisiología de las cactáceas CAM. Están ampliamente distribuidas en el Caribe, América Central y América del Sur en una variedad de hábitats forestales secos. Presentan ovarios superiores e inferiores, hojas anchas aplanadas que llevan a cabo fotosíntesis C3, areolas con

producción de hojas, madera fibrosa muy densa, corteza simple sin haces corticales, capas epidérmicas e hipodérmicas de vástagos poco desarrolladas, no presentan tejidos suculentos y habitan principalmente en entornos áridos y mésicos, en base a las descripciones de este género, se afirma que los cactus de tallos suculento se derivan de árboles leñosos C3 no suculentos (Edwards y col., 2005).

2.2 *Pereskia sacharosa*

La especie *P. sacharosa* es una dicotiledónea perteneciente a la familia Cactaceae, subfamilia Pereskioideae y género *Pereskia*; es un arbusto trepador o árbol ligeramente suculento que tiene hojas sustanciales y espinas que derivan de las areolas, ovarios completamente superiores y medio inferiores con colocación basal y parietal; presenta tallos delgados que pueden alcanzar de 2 hasta 8 metros de altura (Edwards y col., 2005). Es originaria de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Hunt y col., 2006).

P. sacharosa presenta hojas alargadas y alternadas, con contorno ovoide y el ápice redondeado, base cuneada y borde entero, que pueden llegar a medir de 7 a 10 cm de largo y 0.6 mm de ancho; se encuentran ancladas a las areolas del tallo por peciolos muy pequeños y poco definidos. El margen de la hoja es suave, carente de lóbulos o dientes; presenta una vena media conspicua de la cual emergen venas laterales pequeñas. A partir de esta divergen las dos mitades respectivas de la hoja, que presentan dos ases vasculares pequeños que permanecen en la vena media cerca de la punta de la hoja. Sus hojas presentan epidermis superior e inferior; la epidermis superior tiene una cutícula relativamente gruesa (0.5 mm) y está formada por 10 capas celulares; la epidermis inferior consta de una sola capa celular revestida con el material ceroso o cutícula. Las células de la clorénquima son rectangulares y elongadas verticalmente, las hojas carecen de las células de apoyo mecánico gruesas y paredes fuertes (esclerénquima) que hacen que estas no sean duras; dicha característica facilita la caída de hojas durante la sequía (Gibson y Nobel, 1986).

El tallo tiene ramas verdes rectas, no presenta estomas ya que estos están presentes en abundancia en las hojas, por lo cual la fotosíntesis es mínima en el tallo. Las células de la epidermis se dividen en un plano paralelo a la superficie del órgano y forman una nueva capa de células (el cambium); las células del cambium sellan el tallo evitando en gran medida la pérdida de agua y la absorción de dióxido de carbono. En el interior del tallo se producen células de paredes delgadas que le añaden una pequeña cantidad de succulencia a este. A partir de las areolas axilares pronunciadas de esta planta, se forman las hojas y los gloquidios que posteriormente generan de dos a cinco espinas por areola de aproximadamente 1 cm de largo; estas espinas foliares le confieren a este género la propiedad de formar parte de la familia Cactaceae (Gibson y Nobel, 1986).

P. sacharosa presenta un ovario que es superior, situado por encima de la unión de las partes del perianto y de los estambres. Las flores de *P. sacharosa* se encuentran agrupadas en la parte apical de las ramas; pueden llegar a medir 4cm y presentan perianto multi seriado; presentan coloración blanca, lavanda o violeta, con 12 o más pétalos que rodean una masa de 200 estambres. Sus antenas se abren longitudinalmente y sus estambres se levantan sobre el pistilo, de manera que la flor abierta muestra 12 lóbulos en los estigmas. El fruto es una baya piriforme, sub globosa, comestible, que encierra pocas semillas de color negro (Gibson y Nobel, 1986).

2.3 Etnofarmacología

La etnofarmacología es la exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos empleados u observados tradicionalmente por el hombre. Se concentra en la descripción de las propiedades medicinales de los remedios utilizados por los habitantes locales, así como también se dirige al estudio de la forma en que estos se seleccionan, preparan y administran. No siempre existen principios activos identificables que justifiquen determinados usos de las plantas dentro de la farmacopea popular (Obón y Rivera, 1991).

La historia del hombre ha estado siempre ligada al medio ambiente que lo rodea; las primeras civilizaciones descubrieron el potencial curativo de las plantas, particularmente la extraordinaria diversidad cultural y florística de México dio lugar a interacciones coevolutivas multifacéticas y un alto patrón de prácticas etnofarmacológicas (Heinrich y col., 2014). El uso de las plantas medicinales por parte de diversos pueblos es guiado por un conocimiento acumulado a través de la interacción de las personas con el medio ambiente y la difusión de información, transmitida de manera directa a través de las generaciones, sin embargo, la confianza en el potencial curativo de las plantas ha disminuido con el auge de la industria farmacéutica (Esteves y col., 2014).

El enfoque etnofarmacológico que permite rescatar el conocimiento popular y tradicional, es considerado una estrategia eficaz en la búsqueda de especies con potencial bioactivo, ya que el estudio de la diversidad biológica de plantas y su uso como medicina tradicional puede ayudar a comprender sus mecanismos de acción, garantizando su uso, operación, y el desarrollo de remedios (Esteves y col., 2014).

La investigación de productos naturales a menudo se vincula con el manejo y conocimiento de fármacos descubiertos gracias a la etnobotánica. Muchos de los medicamentos utilizados actualmente se desarrollaron a partir de plantas medicinales empleadas por los pueblos indígenas (Heinrich y col., 2014).

2.3.1 Aplicaciones de la Etnofarmacología

Las plantas medicinales son definidas como aquellas utilizadas para el mantenimiento de la salud y el tratamiento de enfermedades específicas. Se utilizan en una plétora de formas en países de todo el mundo, tanto en sistemas de medicina simpática, antipática, alopática y homeopática (Smith-Hall y col., 2012).

La aplicación simpática consiste en tratar una enfermedad con un fármaco de origen vegetal que reproduce los mismos síntomas al suministrarse al paciente causando un efecto placebo. La aplicación antipática consiste en aplicar al tratamiento de una enfermedad, productos cuya acción sea contraria a los síntomas observados; este método es muy utilizado en la medicina occidental (Obón y Rivera, 1991). Incluso personas que utilizan sólo la medicina alopática a lo largo de sus vidas probablemente dependan de las plantas, debido a que del 20 al 25% de los medicamentos prescritos son derivados de ellas (Smith-Hall, y col., 2012).

En Sudamérica existe una amplia gama de plantas relevantes para diversos tratamientos de enfermedades infecciosas, trastornos del sistema cardiovascular y nervioso central, cáncer, inflamación, etc. Así como enfermedades prevalentes que, mediante la aplicación alopática de estas plantas, permiten brindar un enfoque en compuestos anti micobacterianos colocándolas como la base fundamental de la farmacología (Heinrich y col., 2014).

2.4 Etnobotánica

La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica, que ha sido definida como el estudio de las interrelaciones entre los grupos humanos y las plantas. Por su naturaleza interdisciplinaria abarca muchas áreas, incluyendo: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, antropología, lingüística, historia y arqueología, entre otras; lo cual permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones (Alexiades y Sheldon, 1996).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos; o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Bermúdez y col., 2005).

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. No existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales; la OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele, 1993).

En dichos principios activos se basa la actividad correspondiente a metabolitos secundarios aislados entre los que destacan alcaloides como la colchicina, fisostigmina, pilocarpina y reserpina; esteroides como la diosgenina, digoxina y digitoxina; flavonoides y compuestos fenólicos como canferol, vitexina, canferol-3-glucosido y quercetina (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011).

Medicamentos esenciales como la atropina (anticolinérgico), codeína (antitusígeno, analgésico), colchicina (anti-gota), digitoxina/digoxina (cardiotónico), vincristina (antitumoral), quinina/artemisinina (antipalúdico), reserpina (antihipertensivo), fisostigmina (colinérgico) y morfina (analgésico), se elaboran a partir de plantas. La actividad biológica de las plantas depende de los metabolitos presentes como es el caso de *Erythroxylon coca* la cual suministra la estructura química para la síntesis de la procaína y otros anestésicos locales afines. O los ñames neotropicales del género Dioscorea, de los cuales se han aislado saponinas que presentan estructura similar a antiinflamatorios de tipo esteroideo capaces de brindar un efecto analgésico (Akerlele, 1993).

A lo largo de la historia las plantas medicinales han acompañado al hombre, y el conocimiento de estas se ha enriquecido durante siglos gracias a la observación y paciencia de los pueblos que han buscado apropiarse de la fuerza curativa de estas. Las plantas de las diferentes comunidades vegetales poseen un sinfín de cualidades

genéticas constituyendo así el material esencial para el cuidado de la salud y un invaluable recurso genético, de ahí la importancia de estudiar estas especies vegetales, y la relevancia de la etnobotánica, ya que sus propósitos principales son proporcionar información pertinente al uso y manejo de las plantas, así como elucidar códigos a través de la definición, descripción e investigación, de los papeles y funciones involucrados en dicho proceso (García, 2007).

2.5 Usos Etnobotánicos del Género *Pereskia*

2.5.1 *P. sacharosa*

En Bolivia existen dos pueblos asentados a orillas de la Amazonía Boliviana, los cuales presentan antecedentes sobre el uso etnobotánico de esta especie en la medicina tradicional. El pueblo Weenhayek emplea sus hojas y frutos para tratar trastornos de la piel, dolor de oídos, dolor de cabeza, insolación, fiebre e irritación de la piel, mientras que las espinas las emplean contra el dolor muscular. Los pobladores afirman que las hojas se deben de utilizar después de la temporada de lluvia (Quiroga, 2013). El pueblo Izoceño guaraní emplea la planta completa para purificar agua y tratar afecciones como hongos e inflamaciones de la piel, pie de atleta, abscesos, furúnculos, diarrea, disentería, fiebre y dolor estomacal (Vaera y col., 2002)

Sus hojas y frutos se emplean para tratar trastornos de la piel, dolor de oídos y para tratar enfermedades gástricas, mientras que las espinas se emplean contra el dolor muscular (de Castro y Scio, 2014).

2.5.2 *P. aculeata*

Sus frutos son empleados como antisifilíticos y expectorantes, sus hojas son empleadas como emoliente debido a su alto contenido de mucilago que permite tratar inflamación y enfermedades de la piel (Quiroga y col., 2013).

2.5.3 *P. bleo*

Las hojas, brotes y flores de esta especie son empleadas como tratamiento para el cáncer y como suplemento general para la salud, trastornos intestinales y de la alimentación (Vaera y col., 2012).

Esta especie es empleada para el tratamiento de hipertensión arterial, diabetes y enfermedades asociadas con reumatismo e inflamación (Nurestri y col., 2009).

2.5.4 *P. grandifolia*

P. grandifolia es empleada en la medicina tradicional para tratar enfermedades relacionadas con el cáncer, hipertensión, presión arterial alta, diabetes, reumatismo, inflamación (Sim y col., 2010), dolor de cabeza, dolor de estómago, úlceras gástricas, hemorroides, dermatitis y como tónico para revitalizar el cuerpo (Quiroga & Arrázola, 2013).

2.6 Actividad Biológica del Género *Pereskia*

2.6.1 *P. sacharosa*

El extracto de las hojas presenta actividad antimicrobiana contra *H. pylori*, bacteria asociada a úlceras gástricas que proporciona la base del uso popular de dicha especie (Uyub y col., 2010).

P. sacharosa presenta propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antirreumáticas y anti ulcerales. Se ha encontrado que tiene actividad citotóxica y efectos anti proliferativos contra varias líneas celulares cancerígenas, tales como la epidermoide nasofaríngea humana, línea celular de carcinoma (KB), línea celular de carcinoma de colon humano (HCT 116), carcinoma de mama dependiente de hormona humana (MCF7), línea celular de carcinoma cervical humano (Hela) y carcinoma de pulmón humano (A549). Los extractos de esta planta inhiben el crecimiento de células cancerígenas mediante la inducción de vías apoptóticas y la

detención del ciclo celular, mediante la regulación del citocromo C, caspasas y la vía c-myc, expresión de p21 y p53 y represión de Akt y Bcl-2.

La acción terapéutica de los compuestos fitoquímicos es dirigida al mecanismo molecular involucrado en la transformación neoplásica, proliferación celular y las vías de señalización en células apoptóticas, dañadas y transformadas. Esta especie posee un componente dietético en sus hojas que favorece al aumento del apetito, generando una relación proporcional entre las dosis de extractos y mayor peso corporal ganado. Por el contrario, *P. sacharosa* también presenta efectos negativos ya que sus componentes pueden presentar una función quelante, ocasionando disminución del nivel de calcio en sangre y, por consiguiente, disminución en la actividad de la vitamina D, esencial para el metabolismo de este mineral, el cual ralentiza el desarrollo de las células cancerosas (referencia). *P. sacharosa* también presenta propiedades antioxidantes, ya que sus compuestos permiten la captura de radicales libres, favoreciendo niveles bajos de hierro en sangre, que en exceso aumentan el riesgo de padecer cáncer en seres humanos (Rahmat y col., 2013).

2.6.2 *P. aculeata*

En esta especie se determinó la presencia de compuesto fenólicos con actividad antioxidante. El extracto obtenido de sus hojas presenta actividad citotóxica contra células de adenocarcinoma de mama humano y leucemia promielocítica (de Castro y col., 2015). Presenta toxicidad contra el protozooario *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de chagas (Valente y col., 2007).

2.6.3 *P. bleo*

Presenta actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas: *P. auruginosa* y *S. choleraesuis*, y contra gram positivas: *B. subtilis* y *S. aureus* (Abdul-Wahab y col., 2009). El extracto de sus hojas presenta citotoxicidad contra células de carcinoma de mama y células KB, siendo inocuo para fibroblastos (Tan y col., 2005).

De esta especie se ha aislado vitexina, que es un flavonoide C-glicosídico (apigenin-8-C- β -D-glucopiranosido), el cual posee efectos anticancerígenos, antioxidantes y antiinflamatorios. Suprime el crecimiento tumoral e induce apoptosis en modelos murinos de coriocarcinoma y en células de cáncer oral *in vitro*. Este compuesto secundario presenta propiedades antioxidantes las cuales le permiten que actúe como catalizador catiónico y aniónico de radicales libres, presentando capacidad reductora férrica. Protege contra la isquemia y reperfusión miocárdica mediante la inhibición de la activación del factor de transcripción NFK β y la consecuente producción de TNF- α e IL-1 β , como respuesta ante el estrés oxidativo. Este metabolito también inhibe la respuesta de contorsión muscular inducida en modelos biológicos (Borghi y col., 2013).

Los alcaloides presentes en las hojas de *P. bleo*: 3,4-dimetoxi- β -fenetilamina, mezcalina, 3-metoxitiramina y tiramina, presentan efectos citotóxicos contra células T-47D, mediante un mecanismo de inducción de muerte celular programada, a través de la activación de la Caspasa-3 y las vías C-myc (Nurestri y col., 2009).

El extracto metanólico no muestra evidencia de efectos adversos tras administración oral en ratones con la dosis mayor de 2500mg/kg, siendo inocuo su consumo para humanos y animales (Sim y col., 2010).

2.6.4 *P. grandifolia*

Esta especie presenta un potencial efecto antimicrobiano contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*, sin embargo, no presenta efecto alguno contra una de las principales bacterias patogénicas, en específico *E. coli* (Philip y col., 2009).

Los extractos obtenidos de sus hojas presentan actividad citotóxica contra el carcinoma de epidermoide nasofaríngeo, cáncer de células cervicales, células KB y células de osteosarcoma, dichos extractos presentan inocuidad para fibroblastos humanos (Nurestri y col., 2009). Mediante estudios de toxicidad de DL₅₀ se ha confirmado que esta especie no muestra citotoxicidad contra células no cancerígenas y fibroblastos. En específico los compuestos fenólicos favorecen a la

ganancia de peso sin signos clínicos adversos de toxicidad (Sim y col., 2010). En estudios en ratas el extracto de esta especie presentó actividad diurética causada por la inhibición de arginina vasopresina, péptido implicado en funciones fisiológicas como antidiuresis (Kazama y col., 2012).

El extracto metanólico no muestra evidencia de efectos adversos tras administración oral en ratones con la dosis mayor de 2500mg/kg, siendo inocuo su consumo para humanos y animales (Sim y col., 2010).

2.7 Composición Química del Género Pereskia

2.7.1 *P. sacharosa*

Jusoh y col., 2014, mediante un análisis cualitativo propusieron la presencia de alcaloides, flavonoides, polifenoles, esteroides y pigmentos, atribuyendo a los tri terpenos (precursores de esteroides en *P. sacharosa* como el lupeol), la actividad quimiopreventiva, antiinflamatoria, antiartrítica, antimalárica y anticancerígena de la planta.

El extracto total hidroalcohólico puede inhibir la proliferación de células cancerosas y causar la apoptosis por varias vías de señalización, presentando actividad citotóxica contra leucemia, melanomas, neuroblastomas y fibroblastomas mediante inducción de apoptosis. Los componentes fitoquímicos comúnmente encontrados en hojas de *P. sacharosa* al igual que en frutas y hortalizas pueden tener mecanismo de quimio prevención complementario de acción, incluyendo la actividad antioxidante y captura de radicales libres (Jusoh y col., 2014).

2.7.2 *P. aculeata*

Dentro de los productos de metabolismo secundario las hojas de *P. aculeata* producen carotenoides como α -caroteno, β -caroteno, luteína, α -criptoxantina y β -criptoxantina (Agostini-Costa y col., 2012); dichos carotenoides corresponden a la provitamina A, los cuales se encuentran en gran concentración en esta especie y le brindan su actividad antioxidante (de Aguiar-Lage y col., 2015). Sus hojas también producen esteroides como Stigmasterol y β -sitosterol; a los fitoesteroides se les atribuyen actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antifúngica (Rahmat y col., 2013).

Esta especie presenta un mayor contenido proteico 19.5-25.5 g/porción de 100g) en comparación con otros vegetales destinados al consumo humano como son la col rizada (1.6 g/porción de 100g), lechuga (1.3 g/porción de 100g), maíz (7.3-10.0g/porción de 100g) y frijoles (18-20 g/porción de 100g). *P. aculeata* tiene una constitución alta del aminoácido esenciales: lisina y triptófano; fibra dietética y minerales: calcio, hierro, zinc, manganeso, magnesio, fósforo, cloro y potasio; vitaminas: vitamina C, vitamina B9 y vitamina E; lípidos: metil palmitato, o leato de metilo y estearato de metilo; monosacáridos: arabinofuranosa, arabinopiranososa, galactopiranososa, ácido galactopiranosilurónico, ramnopiranososa y glucopiranososa; polisacáridos: arabinogalactano y galactomanano (de Castro y Scio, 2014).

Las hojas de *P. aculeata* son comestibles y altamente nutritivas, presentan una alta concentración de biopolímeros de arabinogalactano, aminoácidos y minerales. Los extractos de hojas han mostrado presencia de betalaínas, estos compuestos son empleados como fuente de aminoácidos esenciales, propiedades antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores y anticancerígenos. El cultivo de tejido caloso *in vitro* en medio MS (Murahige & Skoog) en bajas concentración de nitrógeno y suplementado con el regulador de crecimiento vegetal Picloram favorece la síntesis de betalaínas correspondientes a Betanina y Vulgaxantina-I (de Aguiar-Lage y col., 2015).

2.7.3 *P. bleo*

Dentro de los productos de metabolismo primario produce carotenoides y en el metabolismo secundario produce compuestos fenólicos: epicatequina, catequina, α -tocoferol y 2,4-di-tert-butilfenol, vitexina (Abdul-Wahab y col., 2012), quercetina (Filho y col., 2008) y miricetina (Sim y col., 2010); terpenos: dihidroactinidiolida y fitol (de Castro y Scio, 2014); esteroides: β -sitosterol, campesterol y stigmasterol (Nurestri y col., 2009).

Dentro del metabolismo secundario de *P. bleo* se han aislado terpenos, esteroides y compuestos fenólicos, los cuales al ser combinados y administrados en modelos biológicos permiten que se genere sinergismo entre estos contribuyendo a la actividad antioxidante y citotóxica, inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas con base en la concentración, estructura e interacción entre estos (Nurestri y col., 2009).

2.7.4 *P. grandifolia*

Dentro de los productos de metabolismo primario y secundario *P. grandifolia* produce antioxidantes: β -caroteno; compuestos fenólicos: 2,4-di-tert-butilfenol; esteroides: β -sitosterol; flavonoides: fitona (Nurestri y col., 2009).

Esta especie produce los polisacáridos: arabinogalactano y galactomanano, los cuales pueden ser empleados como biopolímeros y aditivos para la industria alimentaria y farmacéutica (de Castro y Scio, 2014).

Los esteroides producidos por el metabolismo secundario de esta especie (β -sitosterol y stigmasterol) presentan actividad antioxidante en mamíferos; estos funcionan como eliminadores de radicales libres y rompen la cadena de complejos de iones metálicos prooxidantes, permitiendo que se inhiba la formación de especies reactivas de oxígeno (Sim y col., 2010).

Tabla 1. Metabolitos Secundarios en Género Pereskia

| Especie | Compuesto | Actividad biológica | Referencia |
|------------------------------|--|---|--|
| <i>P. sacharosa</i> | Lupeol | Anticancerígeno, antiinflamatoria, antimalárica; presenta toxicidad contra <i>H. pylori</i> | Jusoh y col., 2014 Uyub y col., 2010 Rahmat y col., 2013 |
| <i>P. aculeata</i> | Stigmasterol y β -sitosterol. Betanina y Vulgaxantina-I α -carotene y β -carotene, lutein, α -cryptoxanthin, β -cryptoxanthin | Toxicidad contra <i>T. cruzi</i> , antiinflamatorio y antifúngico. Antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores y anticancerígenos. Precursores de provitamina A. | Valente y col., 2007 De castro y col., 2015 Agostini-Costa y col., 2012. |
| <i>P. bleo</i> | Vitexina 3,4-dimetoxi- β -feniletilamina, mezcalina, 3- metoxitiramina y tiramina Quercetina β -sitosterol, stigmasterol, Campesterol y fitol. 2,4-di-tert-butilfenol | Antioxidante, induce apoptosis suprimiendo el crecimiento tumoral. Efecto citotóxico combinado contra células cancerígenas. Antinociceptivo, antioxidante y citotóxico. Antiinflamatorios, antinociceptivo y antibacterianos. Citotoxicidad contra células KB y antioxidante. | Borgghi y col., 2013 Tan y col., 2005 Nurestri y col., 2009 Abdul-Wahab y col., 2009. Guilhon-Carvalho y col., 2015 Rahmat y col., 2013 |
| <i>P. grandifolia</i> | 2,4-di-tert-butilfenol β -sitosterol y stigmasterol. | Citotoxicidad contra carcinoma de epidermoide nasofaríngeo, cáncer de células cervicales, células KB y células de osteosarcoma. Antioxidante, antimicrobiano y antiinflamatorio. | Rahmat y col., 2013. Nurestri y col., 2009 Philip y col., 2009 |

2.8 Cultivo *In vitro* de Tejidos Vegetales

2.8.1 Cultivos de Tejidos del Género *Pereskia*

King (1957), realizó uno de los primeros estudios sobre el cultivo de tejidos *in vitro* en el género *Pereskia*, cultivó *P. bleo* en medio MS suplementado con 20% con leche de coco y 5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético una auxina sintética que presenta actividad herbicida, que, en conjunto con el extracto natural de coco, presenta una gran cantidad de auxinas y citoquininas endógenas, macro y micronutrientes esenciales, los cuales favorecieron la inducción de tejido calloso.

Sachar y Lyer (1959), llevaron a cabo la inducción de embriones nucelares en especies del género *P. aculeata* empleando la combinación de tres reguladores de crecimiento vegetal: Auxinas: 2mg/L ácido indol-3-acético; Citoquininas: 0.5 mg/L kinetina; Giberelinas: 1mg/L de ácido giberélico.

Mauseth (1979), inhibió la dominancia apical rompiendo la dormancia de yemas axilares en *Pereskia aculeata*, empleando la citoquinina 6-N-Bencilaminopurina a través de la medición del efecto de dicho regulador para la inducción de brotes en base a distintos tratamientos desde 1mg/L hasta 10mg/L en medio MS; mediante dicho esquema fue posible la determinación de la segunda fase de la micropropagación correspondiente a la multiplicación del material vegetal, en la especie *P. aculeata* y otras cactáceas, elucidando los factores que determinan el crecimiento de las areolas que promueven la proliferación de brotes en la parte basal.

De Aguiar-Lage y col., 2015, llevo a cabo la generación de tejido calloso de *P. aculeata* para la producción de betalainas a partir de explantes de hojas, cotiledones e hipocotilo en medio basal MS suplementado con la combinación de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas: 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico (2, 4, 10 y 20 μ M) 6-N-bencilaminopurina (0.2, 0.4, 1 y 2 μ M), kinetina (0.2, 0.4, 1 y 2 μ M), picloram, picloram + bencilaminopurina y picloram + kinetina. A diferencia de los explantes de hoja y cotiledón los explantes de hipocótilo

no presentaron oxidación; a partir de estos se estableció un segundo subcultivo de callo con la combinación de tratamientos de Picloram, BA y kinetina. El tratamiento que presentó la mayor generación de tejido calloso friable fue el Picloram administrado de manera individual a una concentración de 20 uM generando un peso fresco de 4.49 gr, mientras que las combinaciones de Picloram 2 uM+BA 0.2 uM y Picloram 20 uM+ KIN 2 uM generaron tejido calloso no friable con un peso fresco de 3.19 gr y de 1.41 gr respectivamente. Mientras que el tejido calloso friable fue generado con el tratamiento 20 uM de Picloram.

De Aguiar-Lage y col., 2015, estableció un esquema de cultivo de células en suspensión en medio MS líquido modificado, reducido a la mitad de su concentración y con suplementación basal 30 uM de nitrógeno en relación 1:8 NH_4^+ y NO_3^- , en el cual las células presentaron una fase de crecimiento exponencial a los 16 días generando una mayor producción de biomasa vegetal, betalaínas y vulgaxantina-I.

Galván (2016), estableció un protocolo completo de micropropagación de *P. sacharosa*, el cual partió de un cultivo establecido en medio MS sembrando segmentos nodales en medios suplementados con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal correspondientes a auxinas y citosinas, ácido-3-indol butírico y 6-N bencilaminopurina: BA 1.5 mg/L 0 mg/L AIB, BA 1.5 mg/L+ 0.5 mg/L AIB, BA 1.5 mg/L+ 1.0 mg/L AIB, BA 1.5 mg/L+ 1.5 mg/ AIB y BA 1.5 mg/L+ 2.0 mg/L AIB. Galván (2016) evaluó durante 3 meses las características morfológicas de los explantes cultivados en cada tratamiento: número de brotes, número de hojas, número de espinas y presencia de raíces, determinando que el tratamiento BA 1.5 mg/L+ 2.0 mg/L AIB presentó una mayor generación de brotes y raíces. Las plántulas completas se aclimataron en vasos desinfectados con sustrato bajo condiciones aisladas en cámara de aclimatación a 23°C y con 40% de humedad relativa, realizando perforaciones de 6 mm de diámetro durante un intervalo de tiempo de dos semanas, generando un porcentaje de sobrevivencia del 100% de *P. sacharosa* a la intemperie.

Macías (2017), estableció un protocolo de cultivo de tejidos para *P. sacharosa*, llevo a cabo un esquema de micropropagación mediante cultivo de explantes establecidos en medio MS con bencilaminopurina y bencilaminopurina+ carbón activado. Seguido de la generación de tejido calloso a partir de hojas en medio MS con ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (2.41mg L⁻¹) o tiazurón (TDZ) (0.5mg L⁻¹) más ácido naftalenacético (ANA) (2mg L⁻¹). Mediante un estudio fitoquímico preliminar de *P. sacharosa*, Macías (2017) sugirió la presencia de metabolitos secundarios correspondientes a β -Sitosterol, 7-O glucósido de luteolina, vitexina y ácido corosólico. La cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides mediante una curva de calibración de ácido gálico y quercetina mostro concentración total equivalente de 26.41 ug de ácido gálico y 235.3 ug de quercetina por gramo de biomasa seca de hoja de *P. sacharosa*.

2.9 Nocicepción

Son los procesos centrales mediante los cuales se codifican y procesan los estímulos nocivos o lesiones hechas contra los tejidos. (Loeser y Treede, 2008).

La nocicepción induce las vías neuroanatómica y neurofisiológica periféricamente en tejidos donde las células lesionadas generan modificaciones en el microambiente de las células nociceptoras, desencadenando una compleja secuencia de eventos que engloban al aferente primario, al ganglio de la raíz posterior, a la asta dorsal medular y al resto de la vía nociceptiva. Efecto reflejado en las células sensoriales las cuales cambian fenotípicamente por los diferentes estímulos nocivos o lesiones que reciben y la persistencia de estos, modificando drásticamente el procesamiento nociceptivo con alteraciones en la calidad y en la cantidad de la sensación dolorosa (Eblen-Zajjur, 2005).

2.10 Actividad Nociceptiva

Todos los receptores son capaces, en mayor o menor medida, de captar la señal dolorosa, sin embargo, existen receptores especializados denominados nociceptores, los cuales son los encargados de captar información y transmitirla en forma de señal dolorosa a través de fibras nerviosas. Existen dos fibras protagonistas en la transmisión de la señal dolorosa que juegan un papel especialmente importante en la transmisión de impulsos, las fibras A δ (fibras mielínicas) y las fibras C (fibras amielínicas) (Arranz-Álvarez y col., 1999).

Cuando se produce una lesión superficial en la piel, se perciben dos clases de dolor: uno inicial, rápido, de corta duración y bien localizado, conocido como dolor primario, que se debe a la actividad de las fibras A δ , y otro, de aparición más tardía, lento, persistente y difuso, conocido como dolor secundario, que se debe a la actividad de las fibras C (Moreno y Prada, 2004).

Las fibras A δ (mielínicas) cuya velocidad de conducción es de 5-20 m/s reciben la información principalmente de los mecanonociceptores y termonociceptores. Son vías de nocicepción rápida, encargadas de la transmisión de los estímulos que provocarán el llamado dolor agudo, con una localización topográfica muy precisa. Las fibras C (amielínicas) tienen una velocidad de conducción de 0,5-2 m/s, son activadas por los nociceptores C polimodales que captan los estímulos eléctricos, mecánicos o químicos. Estas fibras son las encargadas de la transmisión del dolor lento-quemante que provocará a la larga el llamado dolor crónico, característico por su gran imprecisión topográfica y por resultar intolerable (Arranz-Álvarez y col., 1999).

Cuando se produce una lesión tisular causada por rupturas, presiones intensas, quemaduras, frío intenso y prolongado, y lesiones químicas, se desencadena una cascada de liberación de sustancias inflamatorias sensibilizantes o excitadoras de nociceptores, responsables de dolor nociceptivo de tipo inflamatorio (Moreno y Prada, 2004).

Desde las células lesionadas se inicia la liberación de una gran variedad de sustancias; otras son sintetizadas durante los eventos que siguen a la lesión; estas sustancias pueden llegar a sensibilizar o activar directamente a los nociceptores. Entre ellas se encuentran las prostaglandinas, leucotrienos y Sustancia P que son sensibilizadores, mientras que los iones K^+ e H^+ , los transmisores serotonina e histamina o el péptido bradiquinina, son activadores. El conjunto de estas sustancias se denomina sopa o coctel inflamatorio (Maganto y col., 2015).

2.11 Cascada de Señalización Nociceptiva

La lesión tisular induce la producción y liberación de una gran cantidad de mediadores proinflamatorios que se añaden a la sopa inflamatoria. Mediadores como la sustancia P (SP), bradiquinina (BK), prostaglandinas (PG), ATP y la histamina (HT), son capaces de activar receptores en la membrana del aferente primario e incrementar la actividad intracelular de la fosfolipasa C (PLC) la cual, luego de algunos pasos intermedios, entre los que participan el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃), incrementa el calcio intracelular $[Ca^{++}]_i$ debido al aumento de la permeabilidad de la membrana celular y a su liberación a partir de sus depósitos membranosos intracelulares. Este incremento del $[Ca^{++}]_i$ se potencia por el efecto de permeabilización de la membrana de neurotransmisores como los agonistas del ácido glutámico, específicamente los receptores ionotrópicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido amino-metil-propionato (AMPA) y el kainato (Ka), los cuales no solo permeabilizan a la membrana para el calcio, sino también para el sodio, La PLC reduce la permeabilidad de la membrana neuronal al potasio y con ello despolariza a la célula, efecto que se potencia con el incremento del calcio y sodio intracelulares y del potasio e hidrogenión extracelulares. Otros mediadores como la serotonina (5HT), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), HT y PG son capaces de incrementar la actividad de la enzima adenilato ciclasa y así aumentar los niveles de AMPc intracelular, que despolariza adicionalmente a la neurona, debido a la reducción en la permeabilidad al potasio y al aumento en la permeabilidad al sodio de la membrana. Neurotransmisores como la noradrenalina (NA), SP y 5HT reducen directamente la permeabilidad de la membrana neuronal al

potasio lo que contribuye a la despolarización del aferente primario. La despolarización que se genera por las múltiples vías antes descritas activa una gran población de canales ionotrópicos dependientes de voltaje, predominantemente de calcio y de sodio, los cuales y por presencia de hidrogeniones y de ATP incrementan la excitabilidad neuronal y consecuentemente la sensación dolorosa (Eblen-Zajjur, 2005).

2.12 Efectos Generados por la Nocicepción

2.12.1 Dolor

Según la Asociación Internacional del Estudio del Dolor (IASP) este es definido como una experiencia sensorial o emocional desagradable que se encuentra asociado a daño tisular real o potencial. En México 27% de la población adulta sufre de dolor crónico mientras que a nivel mundial se presenta en el 55% de la población. La Academia Americana de Medicina del Dolor informa que el dolor afecta más que las enfermedades crónicas combinadas correspondientes a cáncer, diabetes y padecimientos cardíacos.

El dolor tiene una alta prevalencia y un gran impacto individual, familiar, laboral, social y económico:

- El 30% de la población refiere haber padecido dolor en los días previos.
- El dolor aumenta con la edad, llegando al 42.6% en los mayores de 65 años los cuales padecen más dolor en las extremidades inferiores.
- El dolor crónico tiene una alta incidencia,
- El género femenino se encuentra más afectado que el masculino (SED, 1998).

El dolor a menudo se asocia con la respuesta inflamatoria ayudando al proceso de curación. Sin embargo, la inflamación persistente debe abordarse y gestionarse en consecuencia para reducir el riesgo de desarrollar respuestas corporales patológicas (Montgomery y col., 2017).

Montgomery y col., 2017, afirma; de acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS) la clasificación del dolor puede clasificarse como:

Anatómico: El sistema de clasificación de dolor anatómico describe la región o área específica del cuerpo en la cual se percibe que se está experimentando dolor.

Etiológico: El sistema de clasificación etiológico describe el factor causante del dolor, este se puede subdividir en maligno contra no maligno. Los factores de dolor etiológico incluyen lesión aguda o enfermedad, que puede ser de naturaleza aguda o crónica. Ocasionado por el tratamiento de la enfermedad, incluidas las intervenciones quirúrgicas.

De duración: El sistema de clasificación de duración del dolor representa la duración del tiempo que se experimenta el dolor. Las 2 clasificaciones de duración primaria son dolor agudo y crónico. Este sistema se puede subdividir en 3 categorías:

1. **Agudo:** representa un dolor a corto plazo que se resuelve en 3 a 6 semanas; está relacionado con una lesión o trauma agudo, y actúa como un sistema de advertencia en el cuerpo cuya finalidad es la reparación de tejidos.
2. **Crónico:** representa dolor a largo plazo, 3 meses o más, y se define como dolor continuo o intermitente que persiste del dolor agudo y se asocia comúnmente con diversas enfermedades crónico-degenerativas.
3. **Episódico:** representa dolor de inicio brusco con duración de 30 minutos, se define como la generación de un dolor agudo transitorio cuyo dolor basal está controlado. Bajo este apelativo se incluyen el dolor incidental, el dolor de final de dosis y el dolor irruptivo (Nabal y Madrid, 2002).

Fisiopatológico: El sistema de clasificación fisiopatológica se refiere al mecanismo de lesión del cuerpo que produce dolor. Las dos principales vías fisiológicas son neuropáticas y nociceptivos:

- 1. Dolor Neuropático:** es el resultado de una lesión que afecta al SNC o periférico, y se puede dividir en tres subgrupos mediados por el sistema nervioso simpático, periférico y central. Los síntomas del dolor neuropático incluyen sensaciones alteradas como el entumecimiento, hormigueo, ardor y dolores punzantes.
- 2. Dolor Nociceptivo:** Es una respuesta corporal normal a una lesión y puede ser el resultado de tejidos dañados, como órganos internos, músculos y huesos. Dentro de esta vía fisiológica se encuentran dos categorías que corresponden al dolor somático y al visceral. El dolor somático se refiere a las lesiones en el sistema musculoesquelético, incluida piel, músculos y huesos, mientras que el dolor visceral o referido se correlaciona con tejidos de órganos internos y se puede sentir indirectamente (Montgomery y col., 2017).

2.12.2 Inflamación

La inflamación es una reacción o proceso defensivo natural del sistema inmunológico del organismo como respuesta al daño causado a sus células y tejidos vascularizados, por agentes lesivos como microorganismos, traumatismos, necrosis, agentes químicos o físicos, o reacciones inmunitarias entre otros. Esencialmente, es una respuesta protectora que surge con el fin de aislar, contener la lesión, destruir al agente agresor y posteriormente preparar al tejido dañado para su reparación, proceso que consta de cambios vasculares y celulares mediados por factores químicos que se manifiestan clínicamente. Presenta signos como dolor, calor, rubor y edema, y este es clasificado con respecto a su duración en dos fases:

- **Aguda:** duración mayor y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos y de evolución breve; sus características son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos.
- **Crónica:** tiene una duración mayor y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos.

Una de las funciones características e importantes de la inflamación, es el aporte de leucocitos a la zona de la lesión. Los leucocitos fagocitan a los patógenos, destruyen a las bacterias y a los microorganismos, y degradan el tejido necrótico, pero también pueden prolongar la lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y especies reactivas del oxígeno (Regal y col., 2015).

2.13 Lipopolisacárido de *E. coli*

Los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas son endotoxinas, que constituyen principalmente, la pared celular de estos microorganismos. Estas moléculas han sido aisladas de una gran variedad de bacterias Gram negativas y algunas cianobacterias. La mayoría del conocimiento actual acerca de la biosíntesis, estructura y función de los lipopolisacáridos ha sido obtenido principalmente de estudios con *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. La gran relevancia de estas moléculas en las infecciones bacterianas es particularmente en el choque séptico. La estructura mínima de lipopolisacárido necesaria para el crecimiento de *E. coli* y otras bacterias Gram negativas consiste en el lípido A y dos unidades de ácido 3 -desoximanooctulosónico (Kdo). Este es un motivo sumamente conservado entre los distintos grupos bacterianos. Por el contrario, las porciones de la molécula distales a los residuos de Kdo, no son estrictamente esenciales para el crecimiento y función celulares (Rojas-Campos, 1995). La estructura mínima de LPS es activa como endotoxina y su efecto en mamíferos aumenta la actividad del eje del estrés, a la par con la disminución del eje que controla la actividad metabólica en el organismo (Bertók y col., 1998).

2.13.1 Estructura del LPS

Lípido A

En *E. coli* está constituido por un disacárido de glucosamina unido por un enlace β 1-6, esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos y sustituido por dos grupos fosfato en los extremos 1 y 4^l. Tiene un peso molecular aproximado de 1700 g/mol, y se encuentran cerca de 2×10^6 de residuos en la membrana externa de *E. coli*. La unión del lípido A al primer residuo de Kdo está dada por un enlace α 2-6^l. El esqueleto de diglucosamina está acilado en las posiciones 2 y 2^l con ácidos grasos 3 hidroxilados (3-OH-14:0 o ácido 3 hidroximirístico) mediante un enlace tipo amida. En las posiciones 3 y 3^l la acilación es tipo éster con el mismo tipo de ácidos grasos. Los grupos hidroxilo de los ácidos grasos de las posiciones 2^l y 3^l están a su vez esterificados con ácido láurico y mirístico (Rojas-Campos, 1995).

Núcleo o Core

El oligosacárido nuclear puede ser subdividido en un subdominio interno y uno externo. Los componentes del núcleo interno en *E. coli* incluyen azúcares únicos que son característicos del LPS, tales como el ácido 3 -desoxi-D-manooctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep). El núcleo externo está compuesto por hexosas, principalmente glucosa, galactosa y N -acetilglucosamina (Rojas-Campos, 1995).

Cadena O

Son cadenas específicas unidas al núcleo que consisten en una secuencia repetida de unidades de trisacárido o pentasacárido lineal; también pueden ser polímeros de oligosacáridos ramificados de cuatro a seis azúcares. Los monosacáridos que componen las unidades repetitivas son azúcares neutros y ácidos, amino azúcares, y raras veces azúcares inusuales, tales como 6 desoxihexosas ó 3,6-didesoxihexosas (Rojas-Campos, 1995).

2.13.2 Mecanismo de Acción de LPS

La endotoxina de *E. coli* un constituyente de la pared celular de organismos gramnegativos, desencadena la respuesta inmune innata causada por la inflamación periférica, generando un conjunto coordinado de respuestas fisiológicas, endocrinas y conductuales reguladas por el Sistema Nervioso Central (SNC). Esto ocurre cuando dichas moléculas inflamatorias (LPS), se unen a receptores tipo Toll de células inmunes periféricas, que a su vez producen una serie de mediadores inflamatorios incluidos complemento, prostaglandinas, y citoquinas. A nivel central, inician la señalización de la respuesta de defensa del huésped, generando fiebre y activación hipotalámica-hipofisaria-adrenal, dando como resultado la respuesta conductual de enfermedad.

La respuesta neural a la inflamación no se encuentra limitada a las respuestas inmunes innatas agudas; existen cambios más duraderos en el cerebro que continúan después del episodio inflamatorio inicial, entre los que se incluyen cambios en la excitabilidad neuronal, así como la aparición de comportamiento depresivo o depresión de los ejes tiroideo y gonadal, que puede durar 24 horas o más después de la exposición inicial a una dosis aguda de LPS (Huangming y col., 2012; Riazi y col., 2008, Dantzer y col., 2008).

La respuesta del huésped a LPS resulta de la activación de citocinas y de otras moléculas proinflamatorias que se sintetizan tanto en la periferia como en el SNC, predominantemente en microglía y astrocitos. Citocinas tales como la interleucina IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), tienen efectos potentes sobre la excitabilidad neuronal y alteran las vías enzimáticas que influyen en la síntesis de neurotransmisores (Huangmig y col., 2012; Galic y col., 2012; O'Connor y col., 2009). Las vías de neurotransmisores que se activan durante la respuesta aguda, pueden contribuir a los efectos a largo plazo (Huangmig y col., 2012).

2.14 Síntesis de Interleucina-6

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales. Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y la acción de otras citocinas, como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. IL-6 es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Es el principal mediador de la respuesta de fase aguda; posee efectos antiinflamatorios al ejercer un control parcial sobre la producción de IL-1 y TNF- α (Saavedra y col., 2010).

A nivel central, la IL-6 es importante en la fisiología de la nocicepción y en la fisiopatología del dolor, debido a que es uno de los estimulantes más poderosos del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Su administración lleva a una hipertrofia de las glándulas suprarrenales mediada por el aumento en la producción de hormona adrenocorticotropa (ACTH), lo cual resulta en un incremento del nivel plasmático de cortisol; a su vez, el cortisol ejerce un control negativo sobre la secreción de IL-6. En el sistema inmune, la IL-6 promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. En este sentido, la IL-6 tiene acciones antiinflamatorias y, junto con el aumento en la producción del cortisol, ayuda a controlar la respuesta inflamatoria, e induce la liberación del antagonista del receptor de la IL-1 y del receptor soluble del TNF- α (Saavedra y col., 2010).

2.15 Modelos Murinos

Los modelos animales son herramientas indispensables en la investigación biomédica. Han sido utilizados desde los inicios de la ciencia y continúan siendo utilizados hoy en día para nuestro entendimiento de las funciones individuales de los genes, los mecanismos de diferentes enfermedades y la efectividad y toxicidad de varios fármacos y compuestos químicos. Los genomas de muchos organismos modelo han sido secuenciados, y se ha descubierto que muchos genes se encuentran conservados entre los organismos modelo y el humano. Los ratones son relativamente económicos de criar y mantener. Se pueden reproducir rápidamente y por tanto permiten a los investigadores estudiar la función de genes concretos a lo largo de varias generaciones durante un período de tiempo razonable. Su fisiología y genética han sido estudiadas a profundidad, y pueden compararse a las humanas. A lo largo de varias décadas, se han desarrollado tecnologías, como métodos transgénicos, para estudiar la genética y las funciones de genes específicos. También se han desarrollado varios modelos en ratón de enfermedades humanas para avanzar en los estudios de la patogénesis de las enfermedades, y para evaluar la efectividad y toxicidad de varios fármacos candidatos. Cepas endogámicas, congénicas y transgénicas con fondo genético endogámico son utilizadas comúnmente. Una cepa endogámica se define como una cepa que ha sido cruzada entre parientes por más de 20 generaciones, por ende, los animales de la misma cepa endogámica son considerados genéticamente idénticos. Las cepas congénicas se consiguen a través de retro cruzamientos repetidos con una cepa endogámica por un mínimo de 10 generaciones para seleccionar un único marcador. Las cepas más empleadas en investigación son C57/BL6/J o JN, BALB/c, CD1, SCID, y A/J. (Johanson, 2012).

2.15.1 Cepa C57/BL6/JN

Los ratones C57/BL6/JN, son una cepa endogámica; estos son empleados para el uso como modelos de enfermedades humanas debido a que se cuenta con todo su genoma secuenciado, por lo cual sus antecedentes genéticos permiten emplearlos para estudiar sus respuestas generadas en aplicaciones de investigación médica. Las principales aplicaciones de este tipo de modelos animales se utilizan para determinar las bases moleculares de enfermedades, estudiar la fisiopatología de enfermedades y validar aproximaciones terapéuticas. Esta cepa es útil principalmente para el estudio de patologías endocrinas como la obesidad, hiperfunción e hipofunción del sistema endocrino, que puede deberse a un exceso o disminución de la secreción de hormonas (Johanson, 2012).

2.15.2 Cepa CD1

La apariencia de los ratones CD1 es albina, estos modelos destacan entre los ratones de uso más común en la investigación como un stock exogámico. La variabilidad genética en estos modelos animales exogámicos de investigación puede servir de ventaja en el clonado posicional de rasgos cuantitativos de loci y la selección fenotípica o genotípica de un rasgo en particular. El uso de ratones CD-1 (stocks exogámicos en general) son empleados principalmente en campos de investigación como inmunología, toxicología, oncología, fisiología, patología y envejecimiento. Esta cepa se ha empleado en numerosas investigaciones con numerosas aplicaciones: integración entre la señalización por beta-catenina/Lef-1/Tcf-3 y ER α , necesaria para la regulación génica dependiente de estrógeno en la biología uterina; morfogénesis de los tubos pulmonares; desarrollo específico de células mieloides; evaluación de dispositivos de transcripción ontogénica sintéticos; generación de embriones de ratón para estudiar las variantes de empalme de CstF-64, e investigar la organogénesis de vertebrados; respuesta inmune y síntesis hormonal ante exposición a LPS de *E. coli* (Johanson, 2012).

2.16 Fisiología del Eje Tiroideo

2.16.1 Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas son derivados yodados del aminoácido tirosina; están constituidas por el acoplamiento de dos residuos de tirosina yodada, lo que permite distinguir en su estructura dos anillos bencénicos denominados alfa y beta. La actividad biológica de las hormonas tiroideas va a depender en gran medida, de la posición a la que se incorporen los átomos de yodo dentro de cada anillo (Arce y col., 2006).

El proceso de síntesis de hormonas tiroideas se resume en cinco fases: 1. Síntesis de tiroglobulina; 2. Captación de yodo; 3. Oxidación de yodo; 4. Yodación de la tiroglobulina; 5. Acoplamiento (Arce y col., 2006).

2.16.2 Tirotropina

El principal regulador de la función tiroidea es la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina, una glucoproteína de 28 kDa producida por células tirotropas de la adenohipófisis. Es un dímero constituido por una subunidad alfa y una subunidad beta específica. La TSH actúa sobre la tiroides estimulando la síntesis y secreción de hormonas tiroideas, además estimula el crecimiento tiroideo como consecuencia de un aumento tanto del número como del tamaño de las células foliculares; produce vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo y estimula la angiogénesis (Arce y col., 2006).

La regulación de la secreción de TSH depende principalmente de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) producida principalmente por neuronas localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo. La TRH incrementa la síntesis de cadenas alfa y beta de TSH y modula su glicosilación. La secreción de hormonas tiroideas está regulada por un sistema de retroalimentación negativo ejercido por las propias hormonas tiroideas, que inhiben la síntesis y la secreción de TSH actuando directamente sobre la hipófisis y también de forma indirecta inhibiendo la síntesis y secreción de TRH en el hipotálamo. La TSH al actuar sobre la tiroides

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

presenta un efecto de liberación de tiroxina (T4) y triiodotironina (T3). La T4 es una prohormona precursora de la T3 que corresponde a la hormona tiroidea activa. Dicha transformación depende de una enzima desyodasa que elimina el átomo de yodo situado en la posición 5 del anillo externo de la T4. Se han identificado 3 desyodasas (DI, DII y DIII), sin embargo, la desyodasa tipo II es la que resulta de vital importancia para la generación de T3 en el SNC y en la adenohipófisis, al presentarse situaciones de estrés que modulan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Las hormonas tiroideas ejercen acciones múltiples en el organismo, pero su acción es vital en el metabolismo, el crecimiento y la maduración (Bianco y col., 2013).

2.16.3 Hormona Liberadora de Tirotropina TRH

La TRH es un tripéptido de estructura piroGlu-His-Pro-NH₂. Fue el primer péptido identificado en el SNC, en 1969. En la rata, el gen se localiza en el cromosoma 3, consta de 3 exones y codifica para una proteína precursora de 242 aminoácidos (Prepro-TRH). Al igual que otros péptidos, se encuentra ampliamente distribuido en el SNC pero su función como neurohormona, está restringida a las neuronas del núcleo paraventricular (NPV), sitio desde donde las neuronas TRH proyectan sus axones hacia la eminencia media y liberan su contenido hacia el sistema portal-hipofisiario. Los efectos de TRH en la adenohipófisis son ejercidos sobre las células tirotropas que estimulan la síntesis y glicosilación de las cadenas alfa y B de la TSH, y la liberación de la tirotropina TSH (Arce y col., 2006).

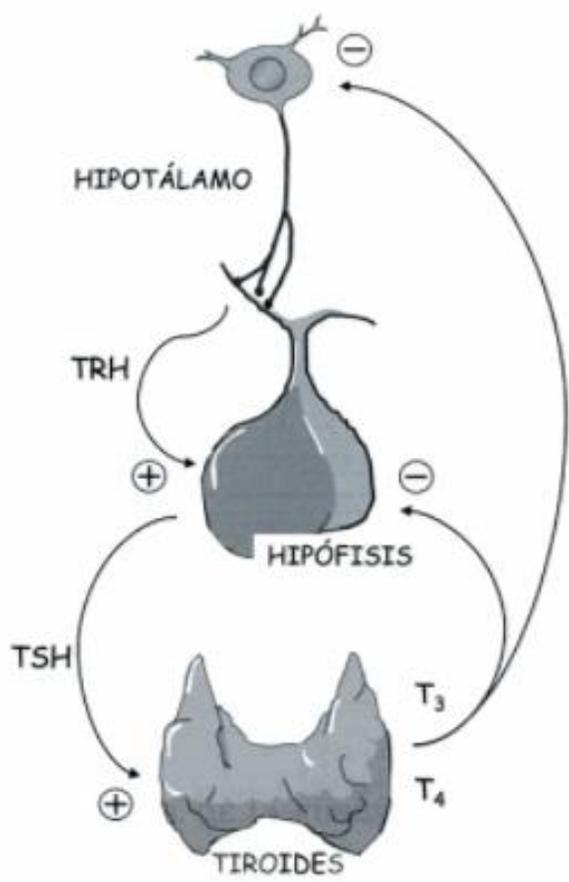


Figura 1. Regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (Arce y col., 2006).

2.17 Fisiología del Eje Adrenal

2.17.1 Corticotropina ACTH

La hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH) es un péptido de 39 aminoácidos que pertenece a la familia de péptidos hipofisarios derivados de la proopiomelacotina (POMC). La secreción de ACTH está regulada por neuronas que se localizan en el núcleo paraventricular del hipotálamo a través de dos factores hipofisiotróficos: la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona antidiurética (vasopresina o AVP). La liberación de ACTH es inducida por múltiples factores siendo uno de los más importantes el estrés tanto físico (hemorragias, hipoglucemia, ayuno, infecciones y ejercicio intenso) como el psíquico (miedo o ansiedad) que son capaces de estimular la hormona liberadora de corticotropina (Arce y col., 2006).

2.17.2 Hormona Liberadora de Corticotropina, CRH

La CRH es un péptido de 41 aminoácidos caracterizada en 1981; el gen se localiza en el cromosoma 8 de la rata, contiene 2 exones y codifica para un precursor de 196 aminoácidos a partir de cuyo procesamiento proteolítico se origina la CRH madura. Las neuronas productoras de CRH se encuentran distribuidas en múltiples áreas del SNC, pero son especialmente abundantes en el núcleo paraventricular del hipotálamo, desde donde se proyectan hasta la eminencia media y tiene su efecto endócrino. Las principales acciones de la CRH sobre la hipófisis son la estimulación de la transcripción del gen de la POMC y la liberación de péptidos derivados de POMC. Además de sus acciones sobre la hipófisis la CRH actúa en múltiples áreas del SNC regulando diversos aspectos de respuesta de reacción al estrés, así la CRH tiene un importante efecto anorexígeno, aumenta la ansiedad, la frecuencia cardíaca, la presión arterial y modula la actividad del sistema inmune (Arce y col., 2006).

La regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal depende también en gran medida de la acción de citocinas producidas por células del sistema inmune. Las principales

implicadas son las interleucinas 1, 6 y el factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α . Todas ellas actúan sobre el hipotálamo estimulando la liberación de CRH, y sobre la hipófisis incrementando la liberación de ACTH. Como consecuencia del aumento de la secreción de ACTH y su acción sobre la glándula adrenal, se producirá un incremento de los niveles circulantes de glucocorticoides que a su vez inhibirán la producción de citocinas, estableciéndose un circuito de regulación entre los sistemas endocrino e inmune (Arce y col., 2006).

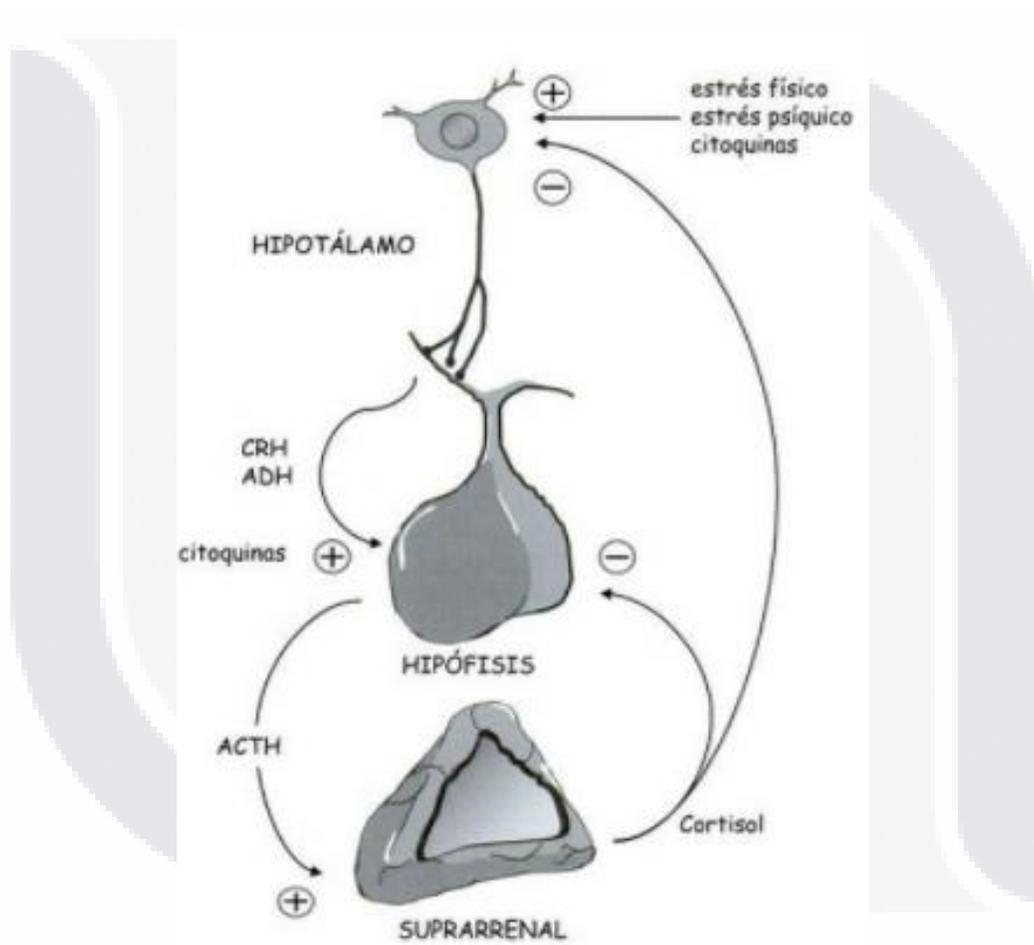


Figura 2. Regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (Arce y col., 2006).

3. Justificación

El presente estudio aportará metodologías para el estudio y aplicación de las propiedades medicinales de la especie *Pereskia sacharosa*, mediante el cultivo de tejidos vegetales en conjunto al establecimiento de sistemas de propagación por esquejes a la intemperie, con la finalidad de brindarle un uso racional a esta especie. Contribuyendo con técnicas cromatográficas para el análisis del perfil químico, mediante el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios y la determinación de sus efectos en modelos biológicos.

La etnofarmacología ha jugado un papel importante en Sudamérica, ya que el uso de los conocimientos ancestrales que se tienen de esta especie ha permitido combatir diversas afecciones, como son infecciones del SNC, procesos inflamatorios, desordenes gastrointestinales y daños por patógenos entre muchos otros, usando sus compuestos mayoritarios de origen natural.

El uso de las plantas como remedio curativo por parte de la humanidad ha permitido la generación de los conocimientos ancestrales que se han vuelto los precursores de avances y estudios científicos en base al potencial bioactivo de estas. En la actualidad son pocos los estudios que se han realizado en esta especie tanto para el perfil químico como en los ensayos biológicos, por lo cual esta investigación se plantea en conjunto con estudios previos sobre efectos negativos de antígenos de *E. coli* a nivel del SNC, basando la hipótesis en la capacidad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios de *P. sacharosa*.

Dadas las circunstancias de consumo y los diversos usos de las plantas con fines medicinales, con la biotecnología se busca implementar esquemas de micropropagación para así establecer, mantener y desarrollar organismos completos generando altos coeficientes de multiplicación durante periodos cortos de tiempo, obteniendo material vegetal suficiente que podría ser empleado para extraer y estudiar los metabolitos totales con propiedades medicinales y aplicarlos en modelos biológicos.

El estudio del perfil químico de esta especie generada en laboratorio y adaptada a la intemperie, recae en la importancia de identificar las diferencias metabólicas en cuanto a producción de compuestos bajo diversas situaciones de estrés ambiental, es decir, identificar en qué condiciones de cultivo (invernadero o intemperie), se lleva a cabo una mejor producción de metabolitos de interés, los cuales reflejaran su potencial bioactivo al ser aplicados en modelos biológicos murinos. Con el fin de ampliar el arsenal terapéutico disminuyendo los efectos secundarios significativos, y con objetivo de determinar actividad y el efecto de dichos compuestos a nivel fisiológico.



4. Hipótesis

Los compuestos mayoritarios de *P. sacharosa* presentaran efectos positivos en el sistema nervioso central y periférico del ratón, en consecuencia, por daños generados por agentes químicos (formalina) mediante pruebas nociceptivas, y por agentes biológicos (Lipopolisacárido de *E. coli*).

En Sistema Nervioso Central:

En el eje adrenal favorecerán al mecanismo de retroalimentación negativa ante situaciones de estrés. Disminuirá la síntesis corticosterona e interleucina 6 circulatoria.

En Sistema Nervioso Periférico:

Efecto antiinflamatorio y analgésico, por lesiones causadas en vías nociceptivas, durante la fase neurogénica y/o inflamatoria.

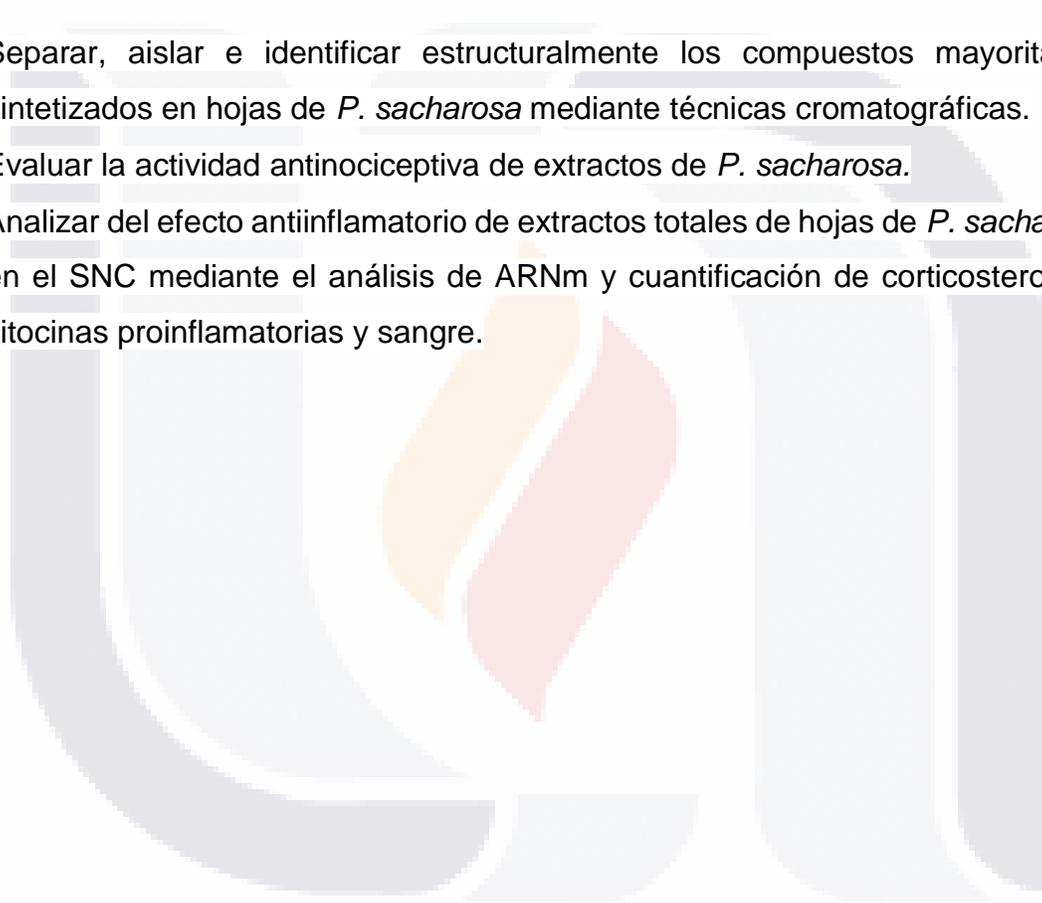
5. Objetivos

5.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de *Pereskia sacharosa* Griseb en el SNC de ratones CD1 y C57/BL6/JN sometidos a un desafío inmunológico e identificar los compuestos bioactivos.

5.2 Objetivos Particulares

- Separar, aislar e identificar estructuralmente los compuestos mayoritarios sintetizados en hojas de *P. sacharosa* mediante técnicas cromatográficas.
- Evaluar la actividad antinociceptiva de extractos de *P. sacharosa*.
- Analizar del efecto antiinflamatorio de extractos totales de hojas de *P. sacharosa* en el SNC mediante el análisis de ARNm y cuantificación de corticosterona y citocinas proinflamatorias y sangre.



6. Metodología

6.1 Micropropagación

Partiendo de plántulas de *Pereskia sacharosa* establecidas bajo condiciones asépticas en el banco de germoplasma de la unidad de biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se llevó a cabo la metodología de micropropagación establecida por Galván, 2016, donde se realizó el subcultivo de segmentos nodales en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con citoquininas (6-Bencilaminopurina, 2 mg/L), para la obtención de brotes. Los brotes obtenidos se sub cultivaron en medio MS suplementado con auxinas (ácido indol butírico, 1.5 mg/L). Se incubaron bajo fotoperiodo de dieciséis horas de luz y ocho horas de oscuridad durante noventa días de cultivo, cuarenta y cinco días con citoquininas, y cuarenta y cinco días con auxinas (Pérez-Molphe-Balch y col., 2002)

6.2 Adaptación y Transferencia a Suelo de las Plantas Generadas *In vitro*

Las plántulas obtenidas se aclimataron empleando la metodología propuesta por (Pérez-Molphe-Balch y col., 2002) con modificaciones. Se retiró el sello de los frascos de cultivo y la tapa de los frascos se fue aflojando durante una semana en el lugar de incubación; el día previo a pasar las plantas a macetas, se retiró la tapa e inmediatamente se colocó sobrepuesta. Una vez transcurrida la semana de aclimatación en el área de incubación se extrajeron las plantas del recipiente de cultivo y se colocaron en una charola de plástico, cuidando de no dañar las raíces en el proceso; las plantas se lavaron cuidadosamente bajo el chorro de agua corriente, eliminando así todos los remanentes de medio de cultivo de las raíces. La parte basal de la raíz se espolvoreo con enraizador comercial (*Raizone-Plus*[®]) el cual contiene ácido indol-3-butírico; se introdujeron las plántulas en macetas con un substrato preparado previamente que contenía *PeatMoss*[®]-arcilla-vermiculita (1:1:1) compactándolo una vez colocada la planta.

Las macetas se colocaron dentro de bolsas de plástico selladas por completo en invernadero a 40°C y 20% de humedad relativa durante seis días, realizándoles a

estas aberturas de 4 cm de diámetro a diario, posteriormente la bolsa se abrió por completo y así se mantuvo sin retirarse por seis días. Las plantas adaptadas a invernadero se trasplantaron a bolsas para vivero, manteniéndose seis días en estas para ser trasplantadas a macetas (60cm diámetro por 40 cm de altura) en las cuales se llevó a cabo su desarrollo durante 15 días. Finalmente, una vez completado su desarrollo en macetas, se llevó a cabo la propagación por esquejes obteniendo dos poblaciones: 30 plantas establecidas en invernadero y 15 plantas establecidas a la intemperie.

6.3 Recolección de Hojas

Tras 15 días de adaptación a la intemperie, se llevó a cabo la recolección de hojas de *P. sacharosa*, cada 15 días durante 12 meses (abril-septiembre del año 2017 y 2018) a las 9:00 horas del día. Posteriormente se secaron a 40°C en estufa durante 3 días, se maceraron con mortero para posteriormente ser procesados.

6.4 Procesamiento de Extractos

Se realizó un procesamiento en orden consecutivo con hexano, cloroformo, etanol y metanol. El material vegetal seco y pulverizado se colocó en un matraz Erlenmeyer con el disolvente correspondiente (1:2 m/v) durante 9 días a una temperatura de 18-24°C realizando la extracción del líquido sobrenadante cada 72 horas. Posteriormente, el residuo se maceró con el respectivo disolvente. El sobrenadante se filtró (15 μ M) y se concentró en roto evaporador (Dest. Buchi Switerland, roto vapor, R-210) a punto de ebullición de cada solvente, a 60 rpm, se recuperó el concentrado del extracto en una caja Petri y se secó en oscuridad a temperatura ambiente. El proceso completo de destilación se realizó 3 veces cada 72 horas para descartar cualquier residuo del disolvente. Este procedimiento se realizó con cada disolvente y se determinó el rendimiento de cada extracto obtenido.

6.5 Cuantificación de Compuesto Fenólicos

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Sim y col., 2010, con modificaciones. Se preparó una curva estándar de ácido gálico (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) con concentraciones conocidas desde 2 hasta 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un volumen final de 1 mL. A cada tubo le fueron añadidos 2.5 mL de agua desionizada y 0.1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA). Después de 6 minutos, a cada tubo se le agregaron 0.25 mL de una solución de carbonato de sodio (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) al 10% y se agitaron en un vortex. La absorbancia de las muestras se monitoreó a 760 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Genova), obteniendo la ecuación de la recta ($y=0.0294x-0.063$) y el coeficiente de correlación ($R^2=0.991$). Mediante la ecuación de la recta se calculó el número de equivalentes de ácido gálico presentes en 8 mg mL^{-1} de extracto etanólico. La determinación del contenido de compuestos fenólicos en el extracto y la curva se realizó por triplicado.

6.6 Cuantificación de Flavonoides

La determinación del contenido de flavonoides se realizó por el método descrito por Jun y col., 2013, con modificaciones. Se preparó una curva estándar con quercetina (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) con concentraciones conocidas desde 50 hasta 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en un volumen final de 1 mL. A cada tubo le fueron añadidos 1.25 mL de agua desionizada y 0.075 mL de nitrito de sodio (marca del reactivo) al 5% y se agitaron en vortex. Después de 5 min a cada tubo se le agregaron 0.15 mL de cloruro de aluminio (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) al 10% agitando en vortex. A los 5 min se añadieron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1M y 2.5 mL de agua desionizada. La absorbancia de las muestras se monitoreó después de 30 min a 510 nm usando un espectrofotómetro (Jenway, Genova), obteniendo la ecuación de la recta ($y=0.0006x+0.1581$) y el coeficiente de correlación ($R^2=0.9943$). Mediante la ecuación de la recta se calculó el número de equivalentes de quercetina presentes en 2 mg mL^{-1} de extracto etanólico. La determinación del contenido de compuestos fenólicos en el extracto y la curva se realizó por triplicado.

6.7 Separación de Compuestos Mayoritarios Mediante Cromatografía en Columna Abierta

6.7.1 Fraccionamiento 1, Extracto Etanólico Total

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 6 gramos de gel sílice 60 fase normal (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 15 mL de cloroformo como fase estacionaria. Se efluyeron a través de esta 0.3 g de extracto etanólico (previamente secado y macerado con gel sílice) mediante una fase móvil de cloroformo:metanol en un gradiente de concentración de 100:0 hasta 0:100 respectivamente. Se realizaron colectas de 10 mL de cada una de las fracciones en tubos de ensayo, obteniendo un total de 83 fracciones. Se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones y se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaron el mismo Rf.

Para el análisis cromatográfico se emplearon placas de gel de sílice de fase normal y fase reversa, en cámara con atmósfera saturada; utilizando diferentes fases móviles. Para la fase normal se empleó cloroformo:metanol 85:15 y para la fase reversa agua:acetonitrilo 70:30. El revelado empleado fue NP/PEG (flavonoides). Los extractos se llevaron a una concentración de 3mg mL^{-1} , y fueron aplicados con capilar, en conjunto con estándares de luteolina, apigenina y quercetina, para comparar la relación entre las distancias recorridas por el soluto y eluyente (RF).

6.7.2 Fraccionamiento 2, Extracto Etanólico Total

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 200 gramos de gel sílice 60 fase normal (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 200 mL de cloroformo como fase estacionaria. Se efluyeron a través de esta 22 g de extracto etanólico (previamente secado y macerado con gel sílice) mediante una fase móvil de cloroformo:metanol en un gradiente de concentración de 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 y 0:100 respectivamente. Se realizaron colectas de 50 mL de cada una de las fracciones en vasos de precipitados, obteniendo un total de 123 fracciones. Los solventes se volatilizaron y se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones con su respectiva fase móvil comparando con el extracto etanólico total y estándares de compuestos fenólicos. Se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaban el mismo Rf de migración.

6.7.3 Fraccionamiento 3 Sección C2F8

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 80 gramos de gel sílice 60 fase normal (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 100 mL de cloroformo como fase estacionaria. Se efluyeron 0.5118 g de extracto etanólico (previamente secado y macerado con gel sílice) mediante una fase móvil de cloroformo:metanol, en un gradiente de concentración de 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 0:100, respectivamente. Se realizaron colectas de 10 mL de cada una de las fracciones en vasos de precipitados, obteniendo un total de 51 fracciones. Se volatilizaron solventes y se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones con su respectiva fase móvil comparando con el extracto etanólico total y estándares de compuestos fenólicos. Se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaban el mismo Rf de migración.

6.7.4 Fraccionamiento 4 Sección C2F9

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 80 gramos de gel sílice 60 fase normal (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 100 mL de cloroformo como fase estacionaria. Se efluyeron 0.3000 g de extracto etanólico (previamente secado y macerado con gel sílice) mediante una fase móvil de cloroformo:metanol en un gradiente de concentración de 100:0, 98:2, 95:5, 93:7, 90:10, 80:20, 70:30, 0:100, respectivamente. Se realizaron colectas de 10 mL de cada una de las fracciones en vasos de precipitados, obteniendo un total de 43 fracciones. Se volatizaron solventes y se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones con su respectiva fase móvil comparando con el extracto etanólico total y estándares de compuestos fenólicos. Se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaban el mismo Rf de migración.

6.7.5 Fraccionamiento 5 Sección C2F15

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 80 gramos de gel sílice 60 fase normal (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 100 mL de cloroformo como fase estacionaria. Se efluyeron 0.5000 g de extracto etanólico (previamente secado y macerado con gel sílice) mediante una fase móvil de cloroformo:metanol en un gradiente de concentración de 100:0, 90:10, 80:20, 78:22, 75:25, 73:27, 70:30, 68:32, 65:35, 60:40, 50:50, 40:60 y 0:100, respectivamente. Se realizaron colectas de 10 mL de cada una de las fracciones en vasos de precipitados, obteniendo un total de 76 fracciones. Se volatizaron solventes y se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones con su respectiva fase móvil comparando con el extracto etanólico total y estándares de compuestos fenólicos. Se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaban el mismo Rf de migración.

6.7.6 Fraccionamiento 6 Sección C2F8, C2F9, C3F5

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 80 gramos de gel sílice 60 fase normal (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 100 mL de cloroformo como fase estacionaria. Se efluyeron 0.6542 g de extracto etanólico de las fracciones C2F8, C2F9, C3F5 (previamente mezcladas, secadas y maceradas con gel sílice) mediante una fase móvil de cloroformo:metanol en un gradiente de concentración de 100:0, 98:2, 95:5, 93:7, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 y 0:100, respectivamente. Se realizaron colectas de 10 mL de cada una de las fracciones en vasos de precipitados, obteniendo un total de 96 fracciones. Se volatilizaron solventes y se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones con su respectiva fase móvil comparando con el extracto etanólico total y estándares de compuestos fenólicos. Se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaban el mismo Rf de migración.

6.7.7 Fraccionamiento 7 Sección C6F12

El fraccionamiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Hernández-Valles y col., 2014, con modificaciones en las cuales se empleó una columna abierta empacada con 30 gramos de gel sílice 90 fase reversa (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, USA) diluida en 50 mL de metanol como fase estacionaria. Se efluyeron 0.6610 g de extracto etanólico de la fracción C6F12 (previamente mezclada, secada y macerada con gel sílice) mediante una fase móvil de agua:acetonitrilo en un gradiente de concentración de 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 30:70, 20:80, 10:40, 0:100, respectivamente. Se realizaron colectas de 10 mL de cada una de las fracciones en vasos de precipitados, obteniendo un total de 52 fracciones. Se volatilizaron solventes y se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones con su respectiva fase móvil comparando con el extracto etanólico total y estándares de compuestos fenólicos. Se unificaron aquellas fracciones en las cuales los componentes presentaban el mismo Rf de migración.

6.8 Análisis Cromatográfico

El extracto etanólico de *P. sacharosa* se hidrolizó con HCL 0.1M (JT Baker®, España) y en conjunto con el extracto crudo enriquecido con los estándares: vitexina y canferol-3-glucósido (Sigma-Aldrich® Co. St Louis, MO, EUA), fue analizado en un equipo convencional de HPLC-MS.

6.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Masas HPLC-MS

El análisis cromatográfico se realizó utilizando un equipo H-CLASS de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas (Acquity Waters, Singapur, Singapur) equipado con una columna Symmetry C18 (100 Å, 150 mm x 4.6 mm de d.i., tamaño de partícula de 5 µm, Waters, Irlanda), con el termostato a 43 °C. La fase móvil consistió en agua acidificada con ácido fosfórico al 0.1% en agua mili Q (A) y metanol (B) (grado HPLC). La elución inicial del gradiente de concentración fue 80% de A: 20% de B, para alcanzar una concentración final de 100% vol/vol, 17 min). La condición inicial se regeneró durante 3 minutos (80% A: 20% B). La velocidad de flujo constante fue de 0,3 mL min⁻¹. El extracto, las fracciones y los estándares puros se diluyeron en metanol y se inyectaron directamente después de la filtración a través de un filtro de 0,2 mm (GHP, acrodisc 13, Waters) en un volumen de 10 µL. La adquisición de datos, el manejo de datos y el control del instrumento se realizaron mediante el software Empower® 3 (Waters, Milford, MA, USA). La detección por fluorescencia se realizó a se realizó a una longitud de onda de 265.5 y 365.5 nm. Los extractos se llevaron a una concentración de 1 mg mL⁻¹ y el volumen de inyección fue de 10 µL (Martínez-González y col., 2017).

6.10 Ensayo Biológico de Actividad Antinociceptiva

Todos los procedimientos experimentales siguieron las pautas sobre estándares éticos para investigaciones de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983), la Guía de NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicación de NIH No. 80-23; revisada en 1978) y la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Además, el protocolo fue aprobado por el Comité Científico y de Ética Animal local del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INP-NC2012), siguiendo las recomendaciones del Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor.

El extracto etanólico de *Pereskia sacharosa* fue re suspendido en el vehículo el cual consistió en 50 microlitros de tween 80 al 0.2% en agua destilada. El extracto fue administrado vía intraperitoneal en ratones de la cepa CD1. En un primer ensayo se compararon los extractos de hojas colectadas en invernadero (100 mg/kg, n=8), hojas colectadas a la intemperie (100 mg/kg, n=8) y tramadol (30 mg/kg, n=6) con respecto al control (tween 80 al 0.2% en agua destilada, n=8).

En un segundo ensayo se seleccionó el extracto con mayor efecto, correspondiente al de hojas colectadas a la intemperie, y se probaron dosis menores de 10 y 30 mg/kg (n=6) en un volumen de 1 mL/100 g de peso corporal, en conjunto con los estándares: luteolina, apigenina, vitexina, canferol y canferol-3-glucósido (n=6), todos en una dosis de 5mg/kg, un fármaco de referencia correspondiente al tramadol (analgésico de tipo opioide; Roche, S.A. de C.V), el cual se preparó a partir de una solución de 100 mg/mL diluido con solución salina y se administró por vía intraperitoneal en una dosis de 30 mg/kg en un volumen de 0.1 mL/ 50 g de peso corporal, fracciones aisladas: fracción C1F6 (30 mg/kg, n=6), C1F9 (30 mg/kg, n=6) y C4F13 en una dosis de 10 y 30 mg/kg (n=6). Antagonistas: naltrexona 1 mg/kg (n=6), (antagonista de opioides no selectivos), flumazenil 5 mg/kg (n=6), (antagonista del receptor GABA_A/benzodiazepinas) y WAY100635 0.32 mg/kg (n=6), (antagonista del receptor 5-HT_{1A}/serotonina), y los tres antagonistas en coadministración individual con la fracción C4F13 (30 mg/kg. N=6). Cada grupo se

comparó con el vehículo conformado por tween 80 al 0.2% (n=6) en agua destilada. Se seleccionaron dosis del extracto total en incremento logarítmico a partir de estudios históricos explorados en nuestro laboratorio y literatura sobre especies de *Pereskia* (González-Trujano y col., 2019; Guerra y col., 2018; Guilhon y col., 2015). Mientras que la fracción de flavonoides aislados y el fármaco de referencia se exploraron utilizando una dosis significativa y similar para comparar la eficacia.

La actividad antinociceptiva se evaluó utilizando la prueba de dolor inducido por formalina con ligeras modificaciones; dicho procedimiento es descrito en detalle por López-Muñoz y col., 1993. Los ratones se colocaron en un cilindro abierto de Plexiglass® durante 30 min para permitirles que se aclimataran a su entorno. Se colocó un espejo detrás del cilindro para permitir una observación sin obstáculos. La prueba antinociceptiva se realizó según lo descrito por Hunskaar y col., (1985), con ligeras modificaciones.

Se administraron las dosis respectivas de vehículo, fármacos de referencia o antagonistas, extractos, estándares y fracciones vía intraperitoneal. Los antagonistas se administraron 15 min antes de los tratamientos. Tras 30 minutos de absorción, se administraron 20 microlitros de formalina al 1% en la pata derecha vía intra plantar y se cuantificó la respuesta conductual correspondiente al número de lamidas y sacudidas; la nocicepción fue observada inmediatamente después de la inyección de formalina de manera bifásica; en la fase neurogénica de 0 a 5 minutos y en la fase inflamatoria de 20 a 25 minutos (Martínez-González y col., 2017).

6.11 Análisis Estadístico de Actividad Antinociceptiva

Todos los grupos experimentales para la evaluación antinociceptiva estuvieron compuestos por seis animales. Los resultados se presentan como la media del porcentaje de inflamación o comportamiento nociceptivo como sacudidas y lamidas / min \pm error estándar en la fase I (0-5 min) y la fase II (20-25 min). El área bajo la curva (AUC) se calculó utilizando el método trapezoidal. El software GraphPad Prism 6.0 se empleó para determinar la significancia estadística entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba *post-*

hoc Dunnet. Los resultados se consideraron significativos cuando los valores de p fueron menores a 0.05 (* $p < 0.05$).

6.12 Ensayo Biológico de Lipopolisacárido de *E. coli*

6.12.1 Animales

Se emplearon 21 ratones macho y hembra de la cepa CD1 adultos de 30-40 g y 39 ratones macho y hembra de la cepa C57/BL6/JN de 20-25 g. Los animales fueron aclimatados bajo condiciones de ambiente estándar por 3 días (luz entre las 07:00 y 19:00 horas, temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$) y alimentados *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados los comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

6.13 Ensayo LPS CD1

Para la cepa CD1 se formaron cinco grupos, el primer de ellos, el grupo vehículo (n=4) estuvo conformado por ratones a los que se les administró el mismo volumen de solución salina y tween 80. A dos grupos, LPS 3h+Pereskia (n=5) y LPS 9h+Pereskia (n=4), se les administró el extracto de *P. sacharosa* en una dosis de 100 mg/kg vía intraperitoneal, 30 minutos antes de someterlos al ensayo con lipopolisacárido. Transcurrido este tiempo, los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con LPS de *E. coli* (Sigma O127: B8; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal. A los últimos dos grupos, LPS 3h (n=4) y LPS 9h (n=4), únicamente se les administro vía intraperitoneal LPS de *E. coli* (Sigma O127: B8; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal (Sánchez y col., 2008).

El experimento se llevó a cabo en un transcurso de 3 y 9 horas, respectivas para cada grupo, observado la respuesta conductual de los animales cada media hora.

6.14 Ensayo LPS C57/BL6/JN

Para la cepa C57/BL6/JN se formaron cuatro grupos, el primer de ellos, el grupo vehículo (n=9) estuvo conformado por ratones a los que se les administró el mismo volumen de solución salina y tween 80. A dos grupos: LPS 3h+Pereskia (n=10) y LPS 9h+ Pereskia (n=10), se les administró el extracto de *P. sacharosa* en una dosis de 100 mg/kg vía intraperitoneal, 30 minutos antes de someterlos al ensayo con lipopolisacárido. Transcurrido este tiempo, los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con LPS de *E. coli* (Sigma O127: B8; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal. A los dos grupos: LPS 3h (n=3), LPS 9h (n=7), únicamente se le administro vía intraperitoneal LPS de *E. coli* (Sigma O127: B8; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal (Sánchez y col., 2008). El experimento se llevó a cabo en un transcurso de 3 y 9 horas respectivas para cada grupo, observado la conducta de los animales cada media hora.

6.15 Análisis Histológico

6.15.1 Cepa CD1

Después de la evaluación conductual antinociceptiva, los ratones tratados con las fracciones (C1F9 o C4F13) o extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.), sacrificados por decapitación con tijeras de disección de ratón, y sus cerebros fueron rápidamente disecados en hielo seco y almacenados a -80 °C hasta su uso. Secciones coronales rostro caudales de Bregma -0,58 mm a -1,94 mm (Paxinos y Franklin, 2001) se cortaron en un criostato (Leica CM3050S, Nussloch GmbH, Alemania) en una de cada seis series de secciones a 18 um, adheridas a Portaobjetos de microscopio Superfrost/Plus (Thermo Fisher Scientific; Cat. n.º 12-550-15) y almacenados a -80 °C para evaluar la presencia de compuestos de *P. sacharosa* en el cerebro.

6.15.2 Cepa C57/BL6/JN

Al transcurrir el intervalo de tiempo respectivo para cada grupo, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital (250 uL, marca Pet's pharma) vía intraperitoneal. En cada animal la sangre se extrajo mediante punción cardiaca, se centrifugó a 3000 rpm por minuto durante 10 min a temperatura ambiente, se aisló el suero sanguíneo y se almaceno a -20°C hasta su procesamiento. Tras la punción cardiaca, los cerebros fueron disectados y congelados en hielo seco pulverizado, envueltos en Parafilm y almacenados a -80°C para su procesamiento. Posterior a la disección de cerebros en cada una de las cepas, estos fueron cortados a 18 micrómetros en criostato a -17°C en la zona de Núcleo paraventricular (PVN) y Eminencia media (EM) para finalmente ser fijados en láminas de hibridación

6.16 Inmunoensayo ELISA para Corticosterona

Para la cuantificación de corticosterona en sangre se empleó un Kit comercial de 96 pozos (*Enzo Life Sciences, catálogo ADI-900-097*). Se determinó densidad óptica contra concentración de una curva patrón desde 0.032 ng/mL hasta 20 ng/mL, a una longitud de onda de 405 nm con corrección entre 570 y 590 nm; la absorbancia para cada muestra de suero sanguíneo para las cepas CD1 y C57/BL6/JN se determinó por duplicado.

6.17 Inmunoensayo ELISA para Inteleucina-6

Para la cuantificación de IL-6 en sangre se empleó un Kit comercial de 96 pozos (*Enzo Life Sciences, catálogo ADI-900-045*). Se determinó densidad óptica contra concentración de una curva patrón desde 0.000781 ng/mL hasta 1 ng/mL a una longitud de onda de 450 nm con corrección entre 570 y 590 nm; la absorbancia para cada muestra de suero sanguíneo para las cepas CD1 y C57/BL6/JN se determinó por duplicado.

6.18 Análisis Estadístico de Inmunoensayos ELISA

Todos los grupos experimentales para el inmunoensayo ELISA estuvieron compuestos de seis a ocho animales. Los resultados se presentan como la media del porcentaje de la concentración de interleucina 6 o corticosterona [pg/mL] \pm error estándar. El área bajo la curva (AUC) se calculó utilizando el método trapezoidal. El software GraphPad Prism 6.0 se empleó para determinar la significancia estadística entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba *post-hoc Dunnet*. Los resultados se consideraron significativos cuando los valores de p fueron menores a 0.05 (* $p < 0.05$).

6.19 Análisis Microscópico de Epifluorescencia y Microscopía Confocal

El extracto integro de *P. sacharosa* y cortes descongelados previamente expuestos al extracto de *P. sacharosa* en conjunto con el LPS se observaron directamente con el microscopio de epifluorescencia, sin cubreobjetos ni ningún medio de montaje que pudiera enmascarar la fluorescencia generada por el extracto o fracciones de *P. sacharosa* o el estándar comercial en el tejido, la fluorescencia se observó con el filtro rojo lejano y DAPI. Las señales fluorescentes se registraron con un microscopio de fluorescencia LED Leica DM 1000 con objetivos HI PLAN 10X/0.25, HI PLAN 20X/0.40 o 40X/0.65, con un set de filtros de paso de banda de 340-380 nm/espejo dicromático de 400 nm/barrera de paso bajo de 425nm; filtro paso banda de 480/40 nm/espejo dicromático 505 nm/filtro paso banda barrera 527/30 nm; filtro de paso de banda 560/40 nm/espejo dicromático 595 nm/filtro de paso de banda de barrera 645/75 nm (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara digital Firewire (DFC450C, Leica) y un software Leica Application Suite. Las secciones se expusieron a cada conjunto de filtros de paso de banda cambiando los sets de filtros, y las imágenes resultantes se procesaron en el software Adobe Photoshop CS6 usando una computadora iMac para crear una imagen compuesta de cada cerebro analizado. Además, se obtuvo una vista panorámica de una sección coronal de ratón con un microscopio confocal Zeiss LSM 900-airyscan 2 y un software Zen blue 3.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH,

Jena, Alemania), para mostrar las posiciones en el cerebro donde se encontraba la fluorescencia.

6.20 Hibridación de ARN

6.20.1 Linearización de Plásmidos de Ratón TRH, CRH y D2

Se emplearon plásmidos de concentración conocida: mCRH (1 ug/ul), mD2 (2 ug/ul) y mTRH (1 ug/ul), y se seleccionaron las enzimas de restricción con base a estos para linealizarlos: Nco I [10,000 U/ml=10 U/ul; 5ul=50 U] para mD2 y Mtrh y Hind III [20,000 U/ml =20 U/ul; 2.5ul=50 U] para mCRH. Se seleccionó el buffer para cada enzima revisando en hoja técnica: Nco I=Buffer 3.1 y Hind III=Buffer 2.1. Se elaboró la mezcla mostrada en la tabla 2 de reacción en hielo frappe, y se incubó a 37°C toda la noche (12-16 horas), al transcurrir las 16 horas se transfirieron a hielo frappe:

Tabla 2. Mezcla de Reacción para Linearización de Plásmidos con sus Respectives Enzimas de Restricción y Buffer.

| | mD2 (Ncol) | mCRH (Hind III) | mTRH (Ncol) | mTRH (Ncol) |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| H2O ul | 165 | 155 | 155 | 155 |
| NEB Buffer ul | 20 (3.1) | 20 (2.1) | 20 (3.1) | 20 (3.1) |
| Plásmido ul | 10 [20 ug] | 20 [20 ug] | 20 [20 ug] | 20 [20 ug] |
| Enzima ul | 5 ul [50 U 100/ul] | 5 ul [100 U 200/ul] | 5 ul [50 U 100/ul] | 5 ul [50 U 100/ul] |
| Vol. Final ul | 200 | 200 | 200 | 200 |

6.20.2 Purificación de Plásmidos

Para cada uno de plásmidos linearizados a temperatura ambiente se añadió un volumen de fenol: cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) [100 fenol:100 CCL:ISO (24:1)]: 100 ul fenol saturado tris-HCl 1 M pH 8.0, y se agitó en vortex por 60 segundos hasta que emulsionó, y 100 ul cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (2400 cloroformo:100 alcohol isoamílico), y de nuevo se agitó en vortex por 60 segundos hasta que emulsionó. La emulsión se centrifugó por 4 minutos a 14000 rpm, se retiró la fase acuosa y se colocó en un tubo de 1.5ml. Se añadió un volumen de agua de hibridación al tubo con fase orgánica (cloroformo: alcohol isoamílico) (200 ul), y se mezcló hasta que emulsionó y se centrifugó 4 min a 14000rpm. Se retiró la fase acuosa y se mezcló con el primer recuperado (300-400 ul). Se agregó un 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo con fase acuosa, se agitó en vortex hasta que emulsionó y se centrifugó 4min a 14000rpm. Se precipitó el plásmido con 1/10 NaCl 5 M (20ul mCRH, 30 ul mD2, 28.5 mTRH) + 2 volúmenes de etanol absoluto (400ul mD2, 600ul mCRH, 570ul mTRH), y se incubó 2 horas a -80°C.

Cada tubo se centrifugó 30 min a 13500 rpm a 4°C y se decantó tomando con puntas amarillas los remanentes acuosos cuidando que la pastilla estuviera adherida a la pared del tubo, se adicionaron 500ul de etanol 70% frío (-20°C) para cubrir la superficie granulosa que ocupaba el plásmido en la pared del tubo. Se centrifugó 10 min a 13500 rpm a 4°C, y se recuperó la fase acuosa. Se dejó secar 10 minutos en estufa a 37°C o a temperatura ambiente, y una vez volatilizado el sobrenadante, los plásmidos purificados se re suspendieron en un volumen que permitió tener una concentración final de 1ug/ul. (mTRH 20 ul, mD2 20 ul y mCRH 15ul), y se almacenaron a -20°C.

6.20.3 Electroforesis de Plásmidos mCRH, mTRH, mD2 Purificados

Se diluyó el buffer TBE 10x a 1x, tomando 80ml de TBE 10x y aforando a 800 ml con 720 ml de agua destilada. se preparó un gel de agarosa de al 1%, pesando 0.8gr de agarosa diluida en 80 ml de buffer TBE 1x, la mezcla de agarosa y TBE1x se calentó por cuatro minutos en microondas a potencia 40 watts. Una vez mezclada la agarosa con el buffer, se vació en cámara de electroforesis y se dejó solidificar por 15 min temperatura ambiente. Una vez solidificado el gel se retiraron los peines y se vaciaron los 800 ml de TBE1x en la cámara de electroforesis.

Se realizó una mezcla en las seis muestras y se colocó en el gel tal como se muestra en la tabla 3, y se corrieron a 120 volts durante 2 horas. El gradiente eléctrico se detuvo una vez que las muestras llegaron 1 cm antes de los pozos. El gel se tiñó por 4 minutos con bromuro de etidio [30ul stock/250 agua], y posteriormente se enjuago con agua destilada durante 4 minutos. El gel se visualizó en transluminador de luz UV (260-290 nm).

Tabla 3. Mezcla de Reacción para Electroforesis de ADN Purificado y Linearizado.

| Pozo | Muestra | Plásmido completo o digerido | H2O | Colorante | Concentración |
|------|---|------------------------------|--------|-----------|--|
| 1 | mCRH/Hind III purificado 1 (inicial) | 3 ul | 5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 10 ul |
| 2 | mCRH/Hind III purificado (Recuperado 100%) | 3 ul | 5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 15 ul No se recuperó nada, desechar. |
| 3 | mCRH/Hind III purificado (70% sin pastillas) | 3 ul | 5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 15 ul No se recuperó nada, desechar |
| 4 | mCRH plásmido completo | 8 ul | 0 ul | 2 ul | 1 ug/ul |
| 5 | mD2/Ncol purificado 1 (inicial) | 3 ul | 5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 10 ul |
| 6 | mD2/Ncol purificado (Recuperado 100%) | 3 ul | 5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 20 ul No se recuperó nada, desechar |
| 7 | mD2/Ncol purificado (Recuperado 70% sin pastilla) | 3 ul | 5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 20 ul No se recuperó nada, desechar |
| 8 | mD2 plásmido completo | 5 ul | 3 ul | 2 ul | 2 ug/ul |
| 9 | mTRH/Ncol purificado | 1.5 ul | 6.5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 20 ul |
| 10 | mTRH/Ncol purificado | 1.5 ul | 6.5 ul | 2 ul | 18-20 ug/ul 20 ul |
| 11 | mTRH plásmido completo | 1.5 ul | 6.5 ul | 2 ul | 1 ug/ul |
| 12 | MPM IV | 3 ul (stock=0.25 ug/ul) | 2 ul | 2 ul | 0.75 ug/ 3ul |

6.20.4 Transcripción *In vitro* mD2/NcoI y mCRH/HindIII rUTPdig-11

Se desnaturalizó el ADN plasmídico en agua en ebullición durante 5 minutos. En tubos eppendorf de 1.5 ul se vertió el siguiente coctel de reacción:

Tabla 4. Coctel de Reacción para Transcripción *in vitro* de ARNm de D2, CRH y TRH.

| Reactivo | [Stock] | [Final] | mCRH/Hi ndIII 2017 | mCRH/Hi ndIII 2018 | mD2/Nco I 2014 | mD2/Nco I 2017 | mD2/NcoI 2018 |
|--------------------------|---------|----------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| dig 11-UTP | 10 mM | 1 mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 11 |
| Buffer Tr. | 10X | 1x | 1.2 | 1.2 | 1 | 1 | 1.2 |
| Ribo A, G, C mix | 10 mM | 3.3 mM | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Ribo UTP | 1mM | 0.1mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Plásmido linearizado | | 20 ug/ul | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| DTT ³ fresco | .1M | 10mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| MQ water | | | 1.3 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.3 |
| <u>Volumen final</u> | | | <u>12</u> | <u>12</u> | <u>10</u> | <u>10</u> | <u>12</u> |
| Inhibidor de ARNsa | 40 u/ul | 40u | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ARN polimerasa Sp6 | 20u/ul | 20u | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Una vez vertido el coctel de reacción se incubó en horno a 37°C durante una hora verificando la temperatura cada 15 minutos, transcurrida una hora se agregó 1 ul extra a cada tubo de ARN polimerasa Sp6 [20u/ul] y se incubo 1 hora a 37°C. Una vez transcurrida la hora se agregó a cada reacción 1 ul de inhibidor de ARNsa [40u/ul] y 2 ul de la enzima ADNsa I [10u/ul. Las mezclas se incubaron en horno a 37°C durante 40 minutos verificando la temperatura cada 10 minutos. Una vez transcurridos los 40 minutos de incubación se ajustó el volumen 100uL con agua destilada:

- a. **16 mCRH/HindIII 2017= 84 H2O MQ**
- b. **16 mCRH/HindIII 2018= 84 H2O MQ**
- c. **14 mD2/NcoI 2014= 86 H2O MQ**
- d. **14 mD2/NcoI 2017= 86H2O MQ**
- e. **16 mD2/NcoI 2018= 84 H2O MQ**

El ARN se precipitó con 10 ul NaCl 5M 1/10 y 300 ul de etanol absoluto toda la noche a -80°C, una vez precipitado se centrifugó 20 min a 13500 rpm a 4°C, para posteriormente decantar. Se añadió 1 volumen de etanol 70% (150 ul) y se centrifugó 10 min a 13500 rpm a 4°C, se decantó y se re suspendió la pastilla en 100 ul de agua (DW) más 0.1% de SDS 10% (10 ul SDS 10%+990EW), y se disolvió calentando a 37°C por 10min agitando en vortex ocasionalmente, para finalmente almacenar a -20°C.

6.20.5 Fijación Tejido Congelado D2, CRH y TRH

Sobre hielo seco se seleccionaron los cortes congelados a -80°C libres de ARNsa, identificando las zonas de eminencia media (EM) y núcleo para ventricular (PVN) con base en los bregmas se identificó el PVN y la EM.

Los tejidos se embebieron en las soluciones en el siguiente orden:

1. 10´ en Paraf 4% y PBS 1x (16 gr paraf+40 ml PBS 10x, 360 ml H2O ISH+240 ul NaOH).
2. 5´ PBS 1x (40 ml PBS 10x+ 360 ml H2O ISH)
3. 5´ PBS 1x (40 ml PBS 10x+ 360 ml H2O ISH)
4. 10´ TTNH2-nh. C. (3580 ul TTNH2 + 396 ml H2O ISH + 1000 ul anhídrido acético, adicionado al momento de uso)
5. 2´ SSC 2x (40 ml stock SSC 20x + 360 H2O ISH)
6. 2´ Etanol 75% (300 ml + etoh abs + 100 ml H2O ISH)
7. 2´ Etanol 80% (320 ml + etoh abs + 80 ml H2O ISH)
8. 2´ Etanol 95% (380 ml + etoh abs + 20 ml H2O ISH)
9. 2´ Etanol 100% (400 ml + etoh absoluto)
- 10.5´ Cloroformo

11.2´ Etanol absoluto

12.2´ Etanol 95% reusado

6.20.6 Mezcla de Hibridación

Los transcritos de ARN y el ADNss (esperma de salmón), se desnaturalizaron en agua en ebullición durante 5 minutos, transcurridos los 5 minutos se colocaron en hielo frappe, y se prepararon 5 ml de mezcla de hibridación empleando 0.5 gr de Dextrán sulfato, 0.5 ml de SSC 20x, 1.25 de Tris 1 M pH8, 275 ul de H2O ISH, 50 ul de Denhardt´s 100x, 50 ul de DTTIM, 125 ul de ADNss (esperma de salmon), 2.5 ml Formamida y 250 ul de SDS 10%. A partir de la mezcla de hibridación se elaboró el coctel de hibridación para colocar 60ul por laminilla:

Tabla 5. Coctel de Hibridación *In situ*

| | x1 laminilla | mCRH/Hind III x16+4 | mTRH/Ncol x33+4 | mD2/Ncol x16+2 |
|--------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| Tr dig | 3 ul | 54 ul | 111 ul | 54 ul |
| DTTIIM | 0.5 ul | 9 ul | 18.5 ul | 9 ul |
| Mezcla de hibridación | 56.5 ul | 1017 ul | 2090.5 ul | 1017 ul |
| Total | 60 ul/laminilla | 1080/18 60 ul/lamina | 2220/37 60 ul/lamina | 1080/18 60ul/lamina |

6.20.7 Hibridación *In situ*

Se colocaron 60 ul del coctel de hibridación respectivo (CRH, TRH y D2) en cada lámina, los tejidos se cubrieron con papel Parafilm con la finalidad de distribuir el coctel de hibridación uniformemente. Las láminas cubiertas se incubaron 54°C en estufa, dentro de cámara húmeda con 4 ul de formamida más H2O durante 16 horas.

6.20.8 Lavados Post Hibridación D2 (n=16), CRH (n=16) y TRH (n=33)

Se sacaron las laminillas del horno, tomando una por una y se colocaron en un vaso de precipitados de 100 mL que contenía 80 mL de SSC 1X (4 mL de SSC 20X + 76 mL H₂O ISH), y con una pinza libre de ARNsas, se retiró el Parafilm de cada una de las láminas y posteriormente se colocaron en la caja de tinción, realizando los enjuagues en el siguiente orden:

1. 15´ SSC 1X a Temperatura ambiente en agitación (20 rpm) (30 ml de SSC 20X + 570 ml H₂O)
2. 3´ en 600 ml de buffer 1x sin ARNsa A (60 ml buffer 10x + 540 ml de H₂O)
3. 1 hora en Buffer 1x + ARNsa A (1200ul STOCK [25g/ul] + 60 ml buffer 10x + 540 ml de H₂O) a 37°C en agitación (20 rpm).
4. Terminando este paso se aumentó la temperatura a 65°C.
5. 15´ en SSC 1x en agitación (20 rpm) (30ml SSC 20x + 570 ml de agua destilada)
6. 15´ en SSC 0.5x en agitación (20 rpm) (15ml SSC 20x + 585 ml de agua destilada)
7. 30´ en SSC 0.1x en agitación (20 rpm) a 65°C (3ml SSC 20x + 597 ml de agua destilada)
8. 30´ en SSC 0.1x en agitación (20 rpm) a 65°C (3ml SSC 20x + 597 ml de agua destilada)
9. 5´ en SSC 0.1x en agitación (20 rpm) a temperatura ambiente (3ml SSC 20x + 597 ml de agua destilada)

6.20.9 Incubación con Anticuerpo Ab POD

Las láminas se incubaron en solución de bloque durante 4 horas a temperatura ambiente (25ml de SSC 20x + 5 gr de albumina al 2% + 125 ul de TritónX100 al 0.05% + 250 de H₂O), y se colocaron 60 ul de la mezcla de incubación a cada lamina:84 ul de Ab POD 1:50 + .042 gr de albumina al 1% +12.6 ul de Tritón al 0.3% + 410.4 ul de Buffer (Tris HCL 0.1 M + NaCl .015 M+H₂O pH 7.6) total 4200 ul. Los tejidos se cubrieron con papel Parafilm con la finalidad de distribuir el coctel de hibridación uniformemente, y las láminas cubiertas se incubaron 4°C en, dentro de cámara húmeda durante 48 horas.

6.20.10 Revelado de Láminas Dig Tiramida-DMSO-Alexa 488 (Kit mp 20913, Invitrogen)

Se atemperó DMSO proveniente del kit durante una hora, y las laminillas incubadas a 4°C y las soluciones stock (PBS 10 X o PBT) durante 30 minutos, posteriormente se preparó la mezcla de revelado para 63 laminillas empleando 2673 ul del vial 1, 27 ul del vial 3 y 27 ul de Tyramida-DMSO.

Se retiró cubierta de Parafilm con buffer PB 0.01 M pH 7, se realizaron 4 lavados de 15 a 20 min incubando en vaso coplin con 50 ml de PBT en agitación moderada. Una vez terminados los lavados se colocó la mezcla de revelado uniformemente sobre la preparación empleando papel Parafilm manteniendo la lámina hidratada y con incubación uniforme. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se retiró la cubierta de Parafilm con buffer PB 0.010 pH 7.4 a TA, seguido de 3 lavados con 50 ml de PBT. Se realizó un lavado adicional con PB 0.1 M de 15 a 20 minutos y se dejó secar. Una vez seco se añadió una gota de Alexa 488 a cada laminilla, se cubrió el tejido con un cubreobjetos y finalmente se selló con esmalte el cubreobjetos y se observó en microscopio confocal.

7. Resultados

7.1 Micropropagación

A partir de 9 plantas establecidas en cultivos axénicos en banco de germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se llevó a cabo el cultivo de 30 segmentos nodales (Fig. 3A) para la formación de brotes, empleando 6-bencilaminopurina (2 mg/L) (Fig. 3B), y el posterior enraizamiento de éstos empleando ácido indol butírico (1.5 mg/L), obteniendo un 100% de eficiencia en la generación de plántulas completas (Fig. 3C) con base en la metodología propuesta por Galván, 2016.

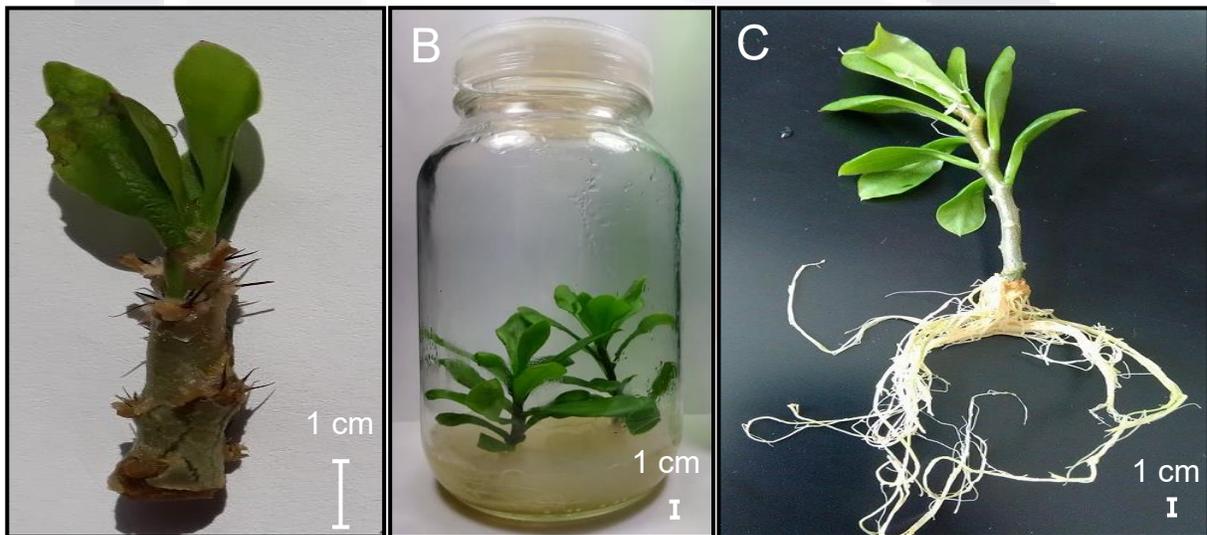


Figura 3. Brotación y Enraizamiento. A) Corte de segmentos nodales (n=30). B) Generación de brotes (Bencilaminopurina 2mg/L). C) Enraizamiento de brotes (Acido indol butírico 1.5mg/L) y generación de plántulas completas (n=30).

7.2 Aclimatación y Establecimiento de Plantas a la Intemperie

Las plántulas completas generadas *in vitro* se cultivaron en macetas de aclimatación con sustrato: Arcilla:Peat-moss:Vermiculita (1:1:1) y se aislaron en bolsas de plástico, realizando cada día aberturas de 4 cm de diámetro, bajo condiciones de invernadero a 40°C y 20% de humedad relativa. Transcurridos los seis días de aclimatación la bolsa se abrió por completo y no se retiró (Fig. 4A). Doce días después se trasplantaron las plantas a macetas de crecimiento con sustrato (Arcilla:Peat:moss:Vermiculita) (1:1:1) en estas se desarrollaron y aclimataron en

invernadero durante un mes (Fig. 4B). La propagación mediante esquejes se llevó a cabo hasta que segmentos nodales alcanzaron un tamaño de 30 cm (Fig. 4C) trasplantándolas a intemperie (Fig. 4D). La recolección de hojas de cada población adaptada a invernadero (n=30) e intemperie (n=15) se realizó cada 15 días a las 09:00 horas durante 12 meses (abril-septiembre del año 2017 y 2018).

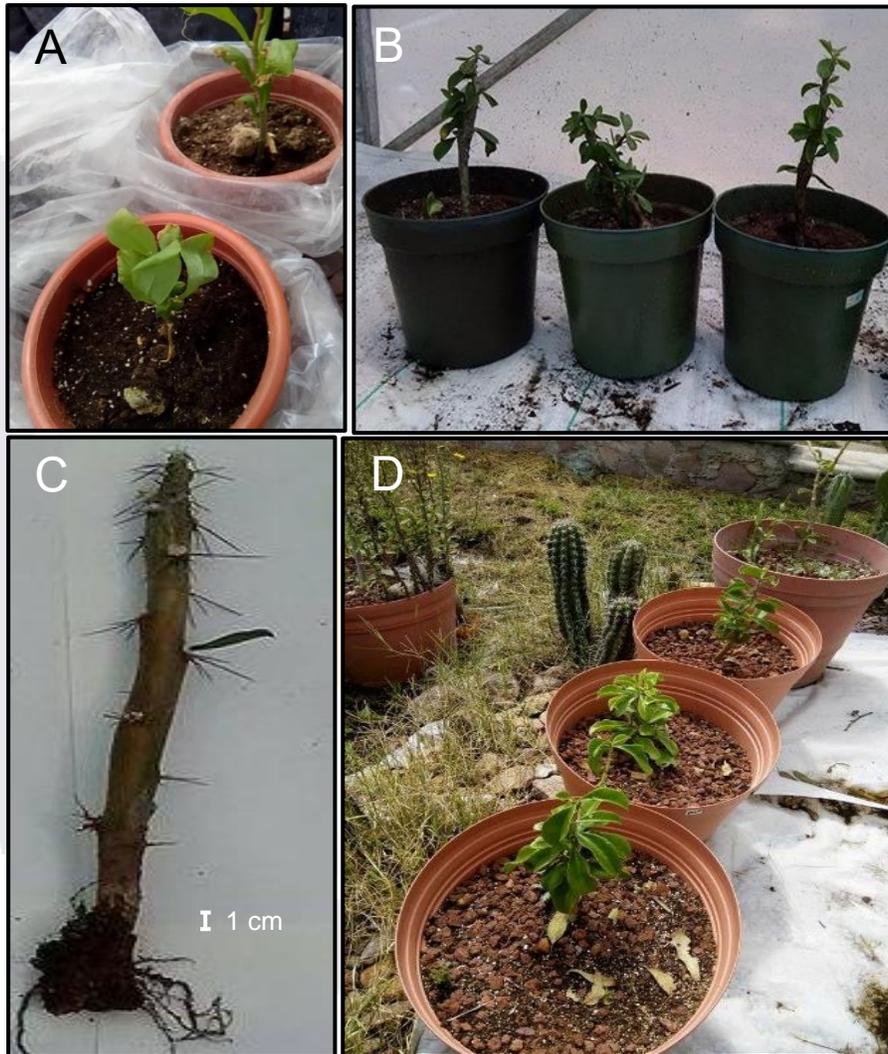


Figura 4. Adaptación y Propagación. A) Aclimatación *P. sacharosa* B) Adaptación de *P. sacharosa* a invernadero (n=30). C) Propagación por esquejes (n=15). D) Adaptación de *P. sacharosa* a la intemperie.

La tabla 6 muestra la tasa de multiplicación de brotes, crecimiento, enraizamiento y sobrevivencia durante las diversas fases de micropropagación, dicha metodología se llevó empleando el esquema implementado por Galván (2016), con

modificaciones correspondientes a la implementación de propagación mediante el cultivo de esquejes.

In vitro la tasa mayor de generación de brotes fue mediante el tratamiento con BA 2mg/L obteniendo un promedio aproximado de 7 brotes por segmento nodal, mientras que la tasa mayor de generación de raíces fue con el tratamiento AIB 1.5 mg/L, obteniendo un promedio aproximado de 6 raíces por segmento nodal, y una mayor respuesta de crecimiento de la planta. Mediante la aclimatación la tasa de generación de brotes fue menor obteniendo 5 brotes y 10 raíces por plántula. Mientras que mediante la propagación por esquejes a la intemperie mostró una mejor respuesta en cuanto a tasa de crecimiento, multiplicación (9 brotes) y enraizamiento (14 raíces). Aunado a la contaminación en los cultivos por patógenos, todos los tratamientos presentaron índices de sobrevivencia del 100% obteniendo dos poblaciones finales correspondientes a 30 plantas aclimatadas en invernadero y 15 plantas aclimatadas a la intemperie.

Tabla 6: Resultados de Micropropagación y Propagación Mediante Esquejes. Se muestra el porcentaje de desarrollo por tratamiento durante cultivo *in vitro*, adaptación a invernadero y propagación mediante esquejes a la intemperie.0

| Etapas de micropropagación | Tratamientos | Tasa de multiplicación | No. de brotes por segmento nodal | Tasa de enraizamiento | No. de raíces por segmento nodal | Porcentaje de sobrevivencia |
|-----------------------------------|---|------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Multiplicación | BA 6.66 uM | 87.5% | 7 ± 0.643 | 14.2% | 2 ± 0.694 | 100% |
| Enraizamiento | AIB 7.38 uM | 37.5% | 4 ± 0.742 | 42.8% | 6 ± 0.587 | 100% |
| Aclimatación a invernadero | AIB + (Peat moss®-tierra vegetal-vermiculita) | 50% | 5 ± 0.643 | 71.4% | 10 ± 0.742 | 100% |
| Adaptación a la intemperie | AIB + (Peat moss®-tierra vegetal-vermiculita) | 100% | 9 ± 0.632 | 100% | 14 ± 0.730 | 100% |

7.3 Procesamiento de Extractos

Las hojas colectadas de *P. sacharosa* (1500 g en peso seco) se colocaron en matraces de 1000 mL con solventes (Hexano, cloroformo, etanol y metanol) en una proporción de (1:2 masa/volumen). Con cada solvente se realizó la maceración del mismo material vegetal durante 9 días a una temperatura de 18-24°C realizando 3 extracciones, una cada 72 horas. Se concentró el extracto a presión reducida dependiente del punto de ebullición de cada extracto a 60 rpm obteniendo un mayor rendimiento con el metanol (534.86 mg extracto/g de hoja seca) y cloroformo (206.04 mg extracto/g de hoja seca), seguido por el etanol (188.45 mg extracto/g de hoja seca) y el hexano (8.25 mg extracto/g de hoja seca); los rendimientos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento de Extractos Procesados de Hojas de *P. sacharosa*. En relación con un total de 1500 g de hojas colectadas a la intemperie y los solventes con los que se elaboró cada extracto.

| Disolvente | Hoja seca (g) | Extracto (g) | Rendimiento (mg de extracto/ g de hoja seca) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------|---|
| Hexano | 1500 | 1.1 | 8.25 |
| Cloroformo | 1500 | 27.2 | 206.04 |
| Etanol | 1500 | 25 | 188.45 |
| Metanol | 1500 | 69.3 | 534.86 |

7.4 Cromatografía en Capa Fina de Extractos Totales

Se realizaron cromatografías en capa fina de los 4 extractos totales previos al fraccionamiento, con la finalidad de determinar el extracto que presentaba los compuestos de interés. En la figura 5 se pueden observar en el carril 3 y 4, bandas de color amarillo y verde a una longitud de onda de 365 nm, correspondientes a los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico y metanólico, mientras que en el carril 1 y 2 las bandas de color rojo corresponden a pigmentos.

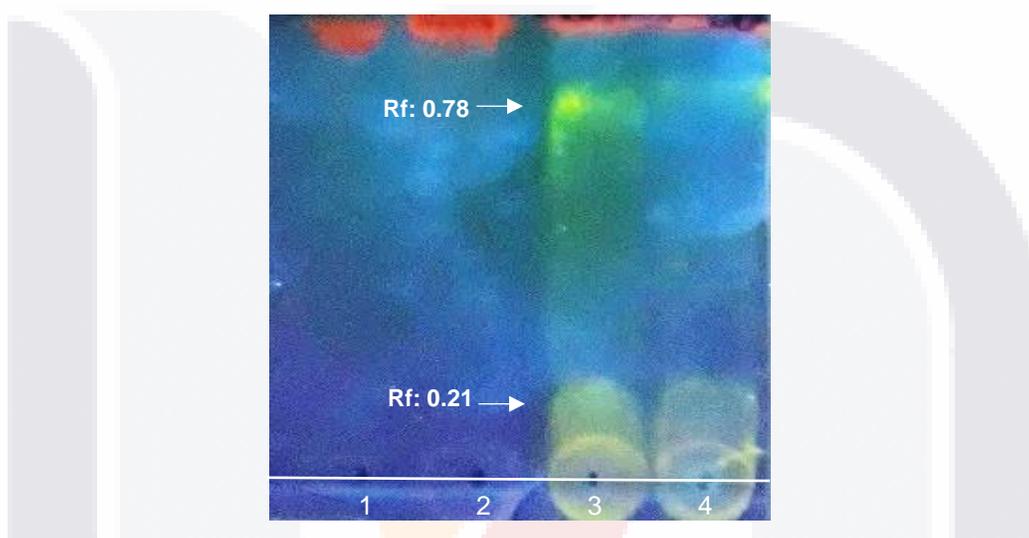


Figura 5. Separación de Flavonoides por Cromatografía en Capa Fina de Extracto de Hojas de *P. sacharosa*. Carriles: 1. Extracto hexánico, 2. Extracto clorofórmico, 3. Extracto etanólico, 4. Extracto metanólico. Fase móvil: cloroformo:metanol (70:30). Revelador: NP/PEG.

7.5 Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides

En la figura 6 se muestra la curva de calibración elaborada con ácido gálico, en la cual al obtener los valores de absorbancia a una longitud de onda de 760 nm fue posible interpolar los valores de una concentración de 8 mg/mL del extracto etanólico, obteniendo un total de 23.75 ug equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa seca. En la figura 7 se muestra la curva de calibración elaborada con quercetina en la cual al obtener los valores de absorbancia a una longitud de onda de 510 nm fue posible interpolar los valores de una concentración de 2 mg/mL del extracto etanólico, obteniendo un total de 3080.73 ug equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa seca.

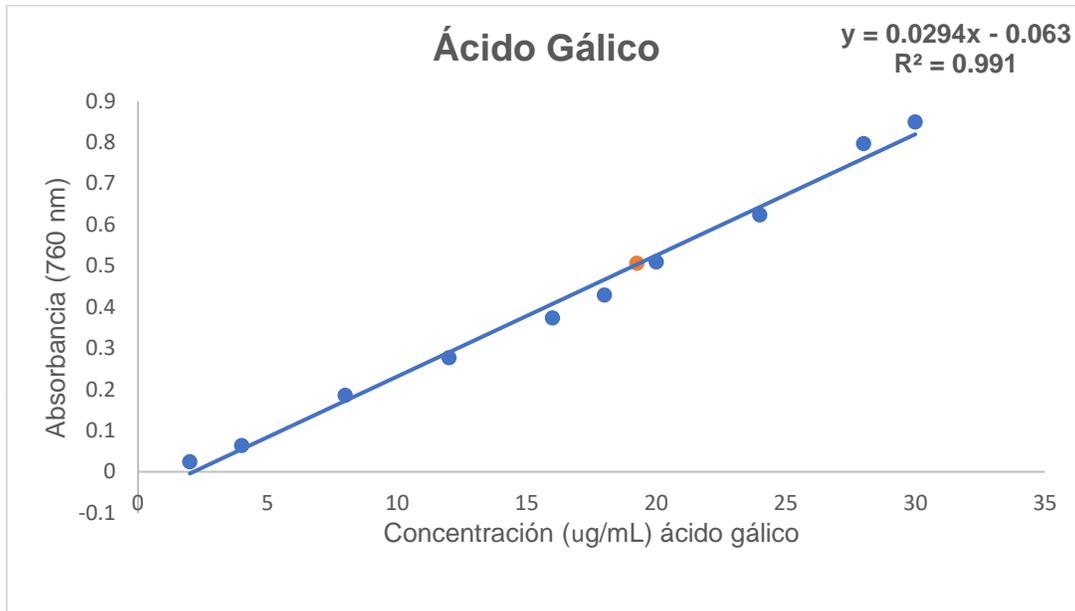


Figura 6. Curva de Calibración de Ácido Gálico. Cambios en las concentraciones conocidas de ácido gálico, y ecuación de la recta para interpolación de extracto etanólico, con un total de 23.75 ug equivalentes de ácido gálico (punto naranja).

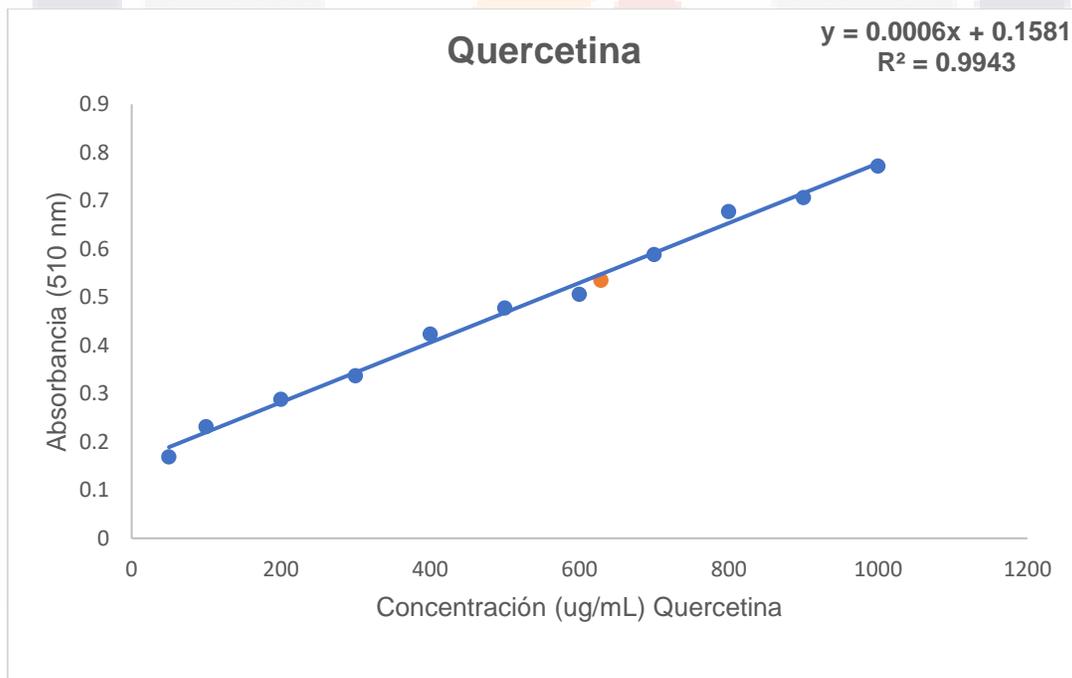


Figura 7. Curva de Calibración de Quercetina. Cambios en las concentraciones conocidas de quercetina, y ecuación de la recta para interpolación de extracto etanólico, con un total de 3080.73 ug equivalentes de quercetina (punto naranja).

7.6 Separación de Compuestos Mayoritarios

7.6.1 Fraccionamiento 1

En el fraccionamiento 1 se aislaron un total de 83 fracciones empleando un gradiente de cloroformo:metanol; las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 21 porciones tal como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Fracciones Individuales Aisladas, Fraccionamiento 1. Mediante gradiente cloroformo:metanol desde 100:0 hasta 0:100, dicho gradiente cambió con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase normal al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas/ agrupadas | Clave |
|---------------------------|----------|-----------------------------------|-------------|
| Cloroformo:metanol 100:0% | 1-23 | 1 | C1F1 |
| Cloroformo:metanol 90:10% | 24-30 | 2-7 | C1F2 |
| Cloroformo:metanol 85:15% | 31-33 | 8-10 | C1F3 |
| Cloroformo:metanol 80:20% | 34-35 | 11-23 | C1F4 |
| Cloroformo:metanol 70:30% | 36-41 | 25 | C1F5 |
| Cloroformo:metanol 50:50% | 42-51 | 26-27 | C1F6 |
| Cloroformo:metanol 40:60% | 57-61 | 28-33 | C1F7 |
| Cloroformo:metanol 30:70% | 62-64 | 34-35 | C1F8 |
| Cloroformo:metanol 20:80% | 65-71 | 36-41 | C1F9 |
| Cloroformo:metanol 10:90% | 72-77 | 42-51 | C1F10 |
| Cloroformo:metanol 0:100% | 78-83 | 52-53 | C1F11 |
| | | 54 | C1F12 |
| | | 55 | C1F13 |
| | | 56 | C1F14 |

| | |
|-------|-------|
| 57-61 | C1F15 |
| 62 | C1F16 |
| 63-64 | C1F17 |
| 65-68 | C1F18 |
| 69-71 | C1F19 |
| 72-77 | C1F20 |
| 78-83 | C1F21 |

Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía de fase normal, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de las bandas, tal como se muestra en la figura 8. En los carriles 4 y 5 (Fracciones 26 y 27, porción C1F6) de la figura 8A, y 4, 5, 6 (Fracciones 39, 40 y 41) de la figura 8B, se muestra la migración de los mismos componentes con relación a su polaridad. Con base en los Rfs de migración y revelado a 250 y 365 nm, se realizó la selección y mezcla de fracciones asiladas que presentaron los mismos Rfs de migración. El revelado mostró que las fracciones 26-27 (C1F6), 34-35 (C1F8) y 36-41(C1F9), se encontraron enriquecidas con compuestos fenólicos.

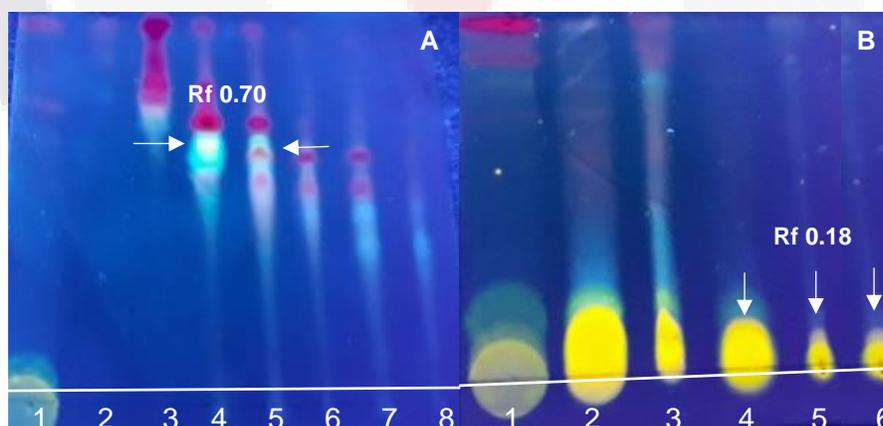


Figura 8. Análisis de Fracciones por Cromatografía en Fase Normal. **A)** Carriles:1 Extracto etanólico total, 2: Fracción 24, 3: Fracción 25, 4: Fracción 26, 5: Fracción 27, 6: Fracción 28, 7: Fracción 29, 8: Fracción 30. Fase móvil: Cloroformo: metanol 90:10. Revelador NP/PEG. **B)** 1: Extracto etanólico total, 2: Fracción 37, 3: Fracción 38, 4: Fracción 39, 5: Fracción 40, 6: Fracción 41. Fase móvil: 70:30 respectivamente. Revelador NP/PEG. Las flechas señalan en las figuras la elución de compuestos similares.

Las fracciones ricas en compuestos fenólicos C1F6, C1F8 y C1F9 se separaron en cromatografía de fase normal tal como se muestra en la figura 9A, identificando en la fracción C1F6 (carril 5) un compuesto con un Rf de 0.65, mismo Rf presente en el estándar apigenina (Flechas blancas). En la figura 9B se observa una cromatografía en fase reversa, en la cual la separación de compuestos de las fracciones C1F8 y C1F9 (carriles 5 y 6) presentan un Rf 0.30 correspondiente a la misma banda que se encuentra presente en el extracto etanólico total (carril 1) (Flechas blancas). En la figura 9C no se observó migración en fase normal de bandas en las fracciones C1F8 y C1F9 (carriles 5 y 6), sin embargo mediante una cromatografía en fase reversa (Fig. 9D) se puede observar un Rf similar de 0.07 correspondiente al estándar apigenina y la fracción C1F6 (carriles 3 y 5 (Flechas blancas), la separación de compuestos de la fracción C1F9 (carriles 5) , presentó un Rf de 0.30 similar al estándar rutina (carril 7), correspondiente a la misma banda que se hizo presente en el extracto etanólico total (carril 2) (Flechas blancas). Esta primer separación e identificación cualitativa de compuestos fenólicos de las fracciones C1F6 y C1F9, permitió llevar a cabo los ensayos biológicos de actividad antinociceptiva de *P. sacharosa*.

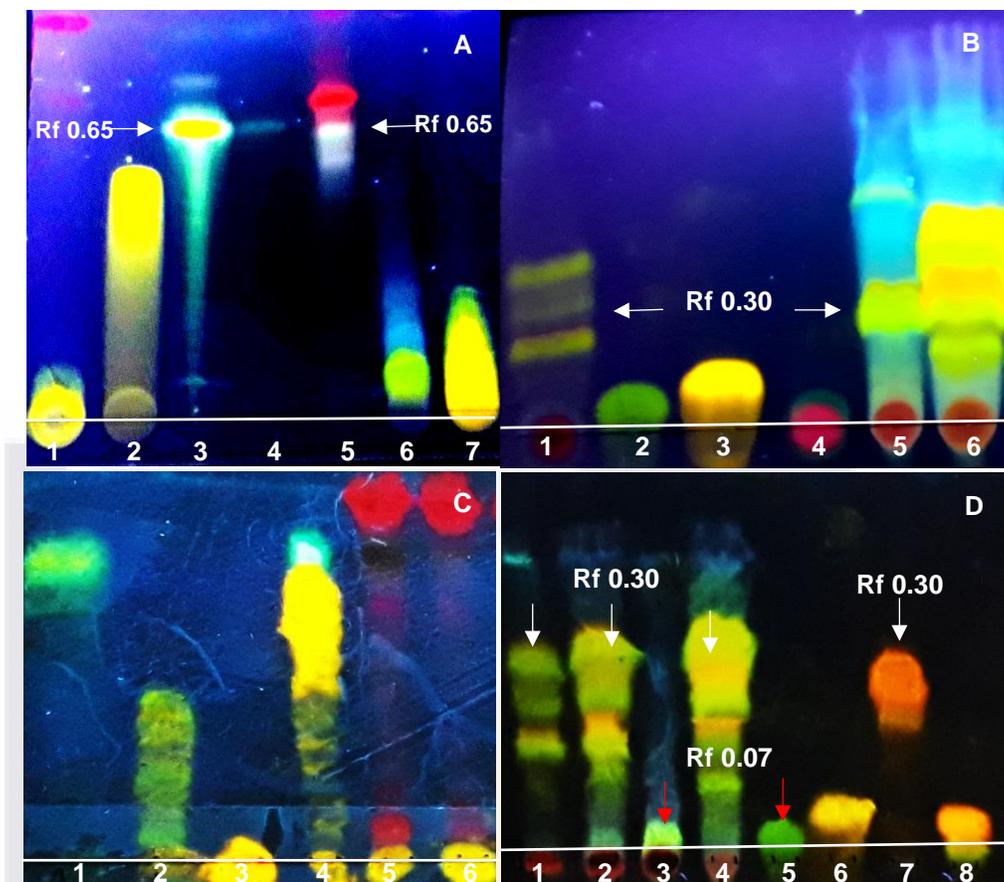


Figura 9. Cromatografías FN y FR, Fraccionamiento 1. **A)** Cromatografía en fase normal. Carriles: 1 Extracto etanólico total, 2: Luteolina, 3: Apigenina, 4: Quercetina 5: Fracción C1F6, 6: Fracción C1F8, 7: Fracción C1F9, Fase móvil Cloroformo:metanol 85:15 **B)** Cromatografía en fase reversa. Carriles: 1 Extracto etanólico total, 2: Apigenina, 3: Luteolina, 4: Fracción C1F6, 5: Fracción C1F8, 6: Fracción C1F9. Fase móvil Agua:acetonitrilo 70:30. **C)** Cromatografía en fase normal. Carriles: 1 Apigenina, 2: Luteolina, 3: Rutina, 4: Quercetina, 5: Fracción C1F8, 6: Fracción C1F9. Fase móvil: Acetato de etilo:Hexano 80:20. **D)** Cromatografía en fase reversa. Carriles: 1: Extracto etanólico total invernadero, 2: Extracto etanólico total intemperie 3: Fracción C1F6, 4: Fracción C1F9, 5: Apigenina, 6: Luteolina, 7: Rutina, 8: Quercetina. Fase móvil: Agua:Acetonitrilo 70:30. Revelador NP/PEG. En la Fig. A las flechas señalan la elución de canferol y la fracción C1F9 con el mismo Rf, en la Fig. B las flechas indican el mismo Rf 0.030 del extracto total etanólico y las fracciones C1F8 y C1F9 en fase reversa, en la fig D las flechas blancas señalan el mismo Rf 0.30 del estándar rutina y las flechas rojas señalan el Rf de 0.07 de los extractos etanólicos, y las fracciones C1F6 y C1F9.

7.6.2 Fraccionamiento 2

En el fraccionamiento 2 se aislaron un total de 123 fracciones empleando un gradiente de cloroformo:metanol, las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 22 porciones tal como se muestra en la tabla 9. Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía de fase normal, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de los Rfs de las bandas, con base en sus diferencias de polaridad. Las secciones enriquecidas con compuestos fenólicos marcadas en la tabla 9, C2F8, C2F9 y C2F15 se seleccionaron para ser fraccionadas mediante cromatografía en columna abierta.

Tabla 9. Fracciones Individuales Aisladas, Fraccionamiento 2. Mediante gradiente cloroformo: metanol desde 100:0 hasta 0:100; dicho gradiente cambió con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase normal al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG. Las fracciones marcadas corresponden a secciones enriquecidas con compuestos fenólicos.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas | Clave |
|---------------------------|----------|---------------------|-------------|
| Cloroformo 100% | 1-31 | 1-4 | C2F1 |
| Cloroformo:metanol 90-10% | 32-45 | 5-7 | C2F2 |
| Cloroformo:metanol 80-20% | 46-56 | 8-11 | C2F3 |
| Cloroformo:metanol 70-30% | 57-67 | 12-21 | C2F4 |
| Cloroformo:metanol 60-40% | 68-80 | 22-31 | C2F5 |
| Cloroformo:metanol 50-50% | 81-92 | 32-33 | C2F6 |
| Cloroformo:metanol 40-60% | 93-103 | 34-36 | C2F7 |
| Cloroformo:metanol 30-70% | 104-111 | 37-40 | C2F8 |
| Cloroformo:metanol 20-80% | 112-116 | 41-42 | C2F9 |
| Cloroformo:metanol 10-90% | 117-122 | 43-45 | C2F10 |
| Cloroformo 100% | 123 | 46-48 | C2F11 |
| | | 49-56 | C2F12 |
| | | 57-58 | C2F13 |

| | |
|---------|--------------|
| 59-62 | C2F14 |
| 63-69 | C2F15 |
| 70-74 | C2F16 |
| 75-80 | C2F17 |
| 81-88 | C2F18 |
| 89-92 | C2F19 |
| 93-103 | C2F20 |
| 104-111 | C2F21 |
| 112-123 | C2F22 |

Se realizó un seguimiento mediante cromatografía de FN, el cual mostró fracciones enriquecidas con compuestos fenólicos (Fig. 10), se combinaron las fracciones en las cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de las bandas. Tal como se muestra en la figura 10A, se combinaron las fracciones 37-41 (C2F8) correspondientes a los carriles 8-11 y las fracciones 40-41 (C2F9) correspondientes a los carriles 12-13, estas fracciones presentaron una banda con un Rf de migración similar al canferol (compuesto con actividad analgésica) de 0.44. Empleando el revelador NP/PEG a una longitud de onda de 365 nm, fue posible identificar bandas con coloración amarilla y naranja, correspondiente a la presencia de sistemas aromáticos conjugados en compuestos fenólicos (Figuras 10B, 10C). Mediante esta técnica cualitativa fue posible llevar a cabo la mezcla de las fracciones 63-69 (C2F15) de los carriles 12-15 (Figura 10B) y 5-6 (Figura 10C). A partir de esta combinación de fracciones: C2F8, C2F9 y C2F15 se llevaron a cabo múltiples fraccionamientos con la finalidad de purificar los compuestos fenólicos.

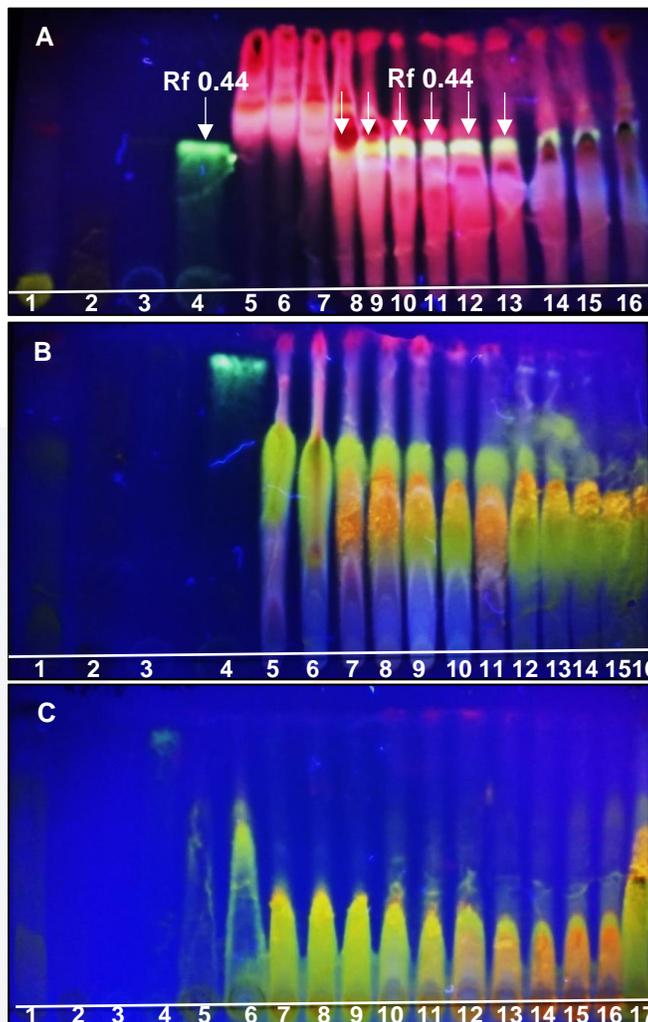


Figura 10. Cromatografías en Capa Fina de Fase Normal (FN), Fraccionamiento 2. **A)** Cromatografía FN fracciones 34-45. Carriles:1 Extracto etanólico total, 2: Luteolina, 3: Quercetina, 4: Canferol 5 (compuesto con actividad analgésica): Fracción 34, 6: Fracción 35, 7: Fracción 36, 8: Fracción 37, 9: Fracción 38, 10: Fracción 39, 11: Fracción 40, 12: Fracción 41, 13: Fracción 42, 14: Fracción 43, 15: Fracción 44, 16: Fracción 45. Fase móvil Cloroformo:metanol 90:10. **B)** Cromatografía FN fracciones 57-67. Carriles:1 Extracto etanólico total, 2: Luteolina, 3: Quercetina, 4: Canferol 5: Fracción 57, 6: Fracción 58, 7: Fracción 59, 8: Fracción 60, 9: Fracción 61, 10: Fracción 62, 11: Fracción 63, 12: Fracción 64, 13: Fracción 65, 14: Fracción 66, 15: Fracción 67, 16: Fracción 68. Fase móvil Cloroformo:metanol 70:30. **C)** Cromatografía FN fracciones 68-80. Carriles:1 Extracto etanólico total, 2: Luteolina, 3: Quercetina, 4: Canferol 5: Fracción 68, 6: Fracción 69, 7: Fracción 70, 8: Fracción 71, 9: Fracción 72, 10: Fracción 73, 11: Fracción 74, 12: Fracción 75, 13: Fracción 76, 14: Fracción 77, 15: Fracción 78, 16: Fracción 79, 17: Fracción 80. Fase móvil Cloroformo:metanol 60:40. Revelador NP/PEG. Las flechas en la Fig. A señalan la presencia de canferol con mismo Rf que las fracciones aisladas. Las figuras B y C señalan la elución y presencia de sistemas aromáticos conjugados a compuestos fenólicos.

7.6.3 Fraccionamiento 3 (C2F8)

En el fraccionamiento 3 se aislaron un total de 51 fracciones empleando un gradiente de cloroformo:metanol, las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 11 porciones tal como se muestra en la tabla 10. Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía de fase normal, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de los Rfs de las bandas, con base en sus diferencias de polaridad. La sección enriquecida C3F5 con compuestos fenólicos marcada en la tabla 10, se identificó de manera cualitativa mediante cromatografía FN.

Tabla 10. Purificación de la Fracción C2F8, Fraccionamiento 3. Mediante gradiente cloroformo: metanol desde 100:0 hasta 0:100, dicho gradiente cambió con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase normal al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG. Las fracciones marcadas corresponden a secciones enriquecidas con compuestos fenólicos.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas | Clave |
|---------------------------|----------|---------------------|-------------|
| Cloroformo 100% | 1-5 | 1-5 | C3F1 |
| Cloroformo:metanol 95-5% | 6-22 | 6-7 | C3F2 |
| Cloroformo:metanol 90-10% | 23-29 | 8-10 | C3F3 |
| Cloroformo:metanol 85-15% | 30-37 | 11-14 | C3F4 |
| Cloroformo:metanol 80-20% | 38-44 | 15-26 | C3F5 |
| Cloroformo:metanol 70-30% | 45-50 | 27-28 | C3F6 |
| Cloroformo 100% | 51 | 29-35 | C3F7 |
| | | 36-37 | C3F8 |
| | | 38 | C3F9 |
| | | 39 | C3F10 |
| | | 40-51 | C3F11 |

En la figura 11, carriles 3,4,5 y 6 se muestra la migración y revelado de los compuestos fenólicos correspondientes a las fracciones 23-26; dicha migración presenta una banda con un Rf de 0.44, mismo Rf en el que se hace presente el canferol (carril 2). Posteriormente las fracciones 23-26 se unificaron con las fracciones 15-22 también debido a su similitud en compuestos fenólicos y Rf de 0.44, dando lugar a la fracción C3F5. Las fracciones 27-29 no se consideraron debido a que no presentaron compuestos con un Rf de migración similar al del canferol.

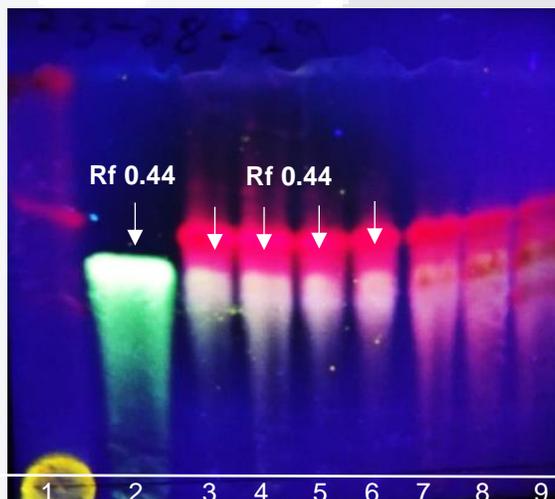


Figura 11. Análisis de la Fracción C3F5 Mediante Cromatografía en Fase Normal del Fraccionamiento C2F8. **A)** Carriles: 1 Extracto etanólico total, 2: Canferol, 3: Fracción 23, 4: Fracción 24, 5: Fracción 25, 6: Fracción 26, 7: Fracción 27, 8: Fracción 28, 9: Fracción 29. Fase móvil: Cloroformo: metanol 90:10. Revelador NP/PEG. Las flechas señalan la presencia de canferol con mismo Rf 0.44 que las fracciones agrupadas en la porción C3F5.

7.6.4 Fraccionamiento 4 (C2F9)

En el fraccionamiento 4 se aislaron un total de 43 fracciones empleando un gradiente de cloroformo:metanol, las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 19 porciones tal como se muestra en la tabla 11. Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía FN, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica a los Rfs de las bandas, con base en sus diferencias de polaridad. En la fracción C4F13 enriquecida con compuestos fenólicos marcada en la tabla 11, se identificó y se propuso de manera cualitativa mediante cromatografía FN la presencia de canferol, dicha fracción se evaluó en modelos biológicos mediante el ensayo de actividad antinociceptiva.

Tabla 11. Purificación de la Fracción C2F9, Fraccionamiento 4. Mediante gradiente cloroformo:metanol desde 100:0 hasta 0:100, dicho gradiente cambiaba con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase normal al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG. Las fracciones marcadas corresponden a secciones enriquecidas con compuestos fenólicos.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas | Clave |
|---------------------------|----------|---------------------|-------|
| Cloroformo 100% | 1-8 | 1 | C4F1 |
| Cloroformo:metanol 98-2% | 9-17 | 2-3 | C4F2 |
| Cloroformo:metanol 95-5% | 18-23 | 4-6 | C4F3 |
| Cloroformo:metanol 93-7% | 27-31 | 7-8 | C4F4 |
| Cloroformo:metanol 90-10% | 32-35 | 9 | C4F5 |
| Cloroformo:metanol 80-20% | 36-39 | 10-12 | C4F6 |
| Cloroformo:metanol 70-30% | 40-42 | 13-14 | C4F7 |
| Metanol 100% | 43 | 15 | C4F8 |
| | | 16-18 | C4F9 |
| | | 19 | C4F10 |
| | | 20 | C4F11 |
| | | 21 | C4F12 |

| | |
|-------|--------------|
| 22 | C4F13 |
| 23-24 | C4F14 |
| 25-26 | C4F15 |
| 27-29 | C4F16 |
| 30-31 | C4F17 |
| 32-39 | C4F18 |
| 40-43 | C4F19 |

En la figura 12, los carriles 5 y 6 se muestra la migración y revelado de compuestos fenólicos empleando cromatografía FN correspondientes a las fracciones 22 y 23-24; estas fracciones presentaron una banda con un Rf de 0.30, mismo Rf que se hace presente en el estándar de canferol (carril 3; compuesto con actividad analgésica). La fracción purificada 22 (C4F13) fue empleada para evaluar su efecto analgésico en ensayos biológicos de actividad antinociceptiva a dosis de 10 y 30 mg/kg.

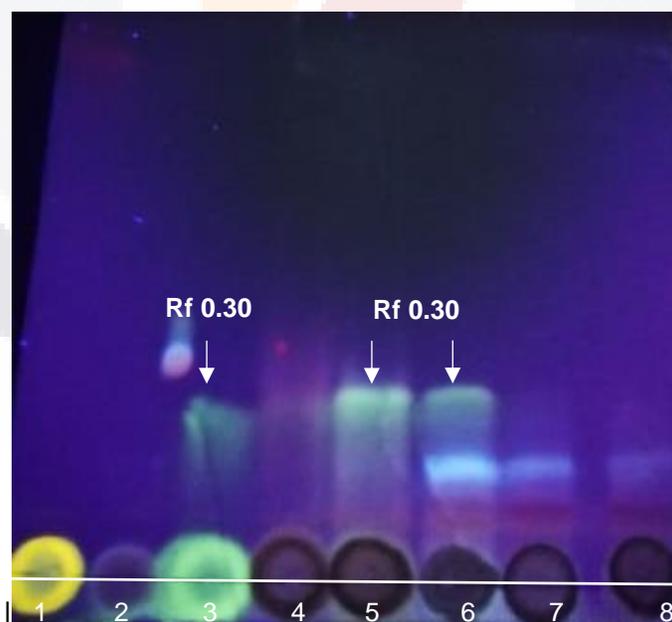


Figura 12. Cromatografía en Fase Normal, Fracción C2F9 Posterior a Sub-Fraccionamiento C2F9. Carriles: 1: Extracto etanólico total, 2: Sección C2F9 de fraccionamiento 1, 3: estándar de canferol, 4: Fracción C4F12, **5: Fracción C4F13**, 6: Fracción C4F14, 7: Fracción C4F15. 8: Fracción C4F16. Fase móvil Cloroformo:metanol 95:5. Revelador NP/PEG. Las flechas señalan los compuestos aislados con el mismo RF de 0.30 que el estándar canferol.

7.6.5 Fraccionamiento 5 (C2F15)

En el fraccionamiento 5 se aislaron un total de 76 fracciones empleando un gradiente de cloroformo:metanol, las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 27 porciones tal como se muestra en la tabla 12. Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía FN, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de los Rfs de las bandas, con base a sus diferencias de polaridad. En las fracciones C5F6 y C5F7 se identificó de manera cualitativa mediante cromatografía FN la presencia de compuestos fenólicos.

Tabla 12. Purificación de la Fracción C2F15, Fraccionamiento 5. Mediante gradiente cloroformo:metanol desde 100:0 hasta 0:100, dicho gradiente cambió con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase normal al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG. Las fracciones marcadas corresponden a secciones enriquecidas con compuestos fenólicos.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas | Clave |
|---------------------------|----------|---------------------|-------------|
| Cloroformo 100% | 1-6 | 1-2 | C5F1 |
| Cloroformo:metanol 90-10% | 7-12 | 3-6 | C5F2 |
| Cloroformo:metanol 80-20% | 13-18 | 7-9 | C5F3 |
| Cloroformo:metanol 78-22% | 19-27 | 10 | C5F4 |
| Cloroformo:metanol 75-25% | 28-36 | 11-12 | C5F5 |
| Cloroformo:metanol 73-27% | 37-43 | 13-15 | C5F6 |
| Cloroformo:metanol 70-30% | 44-49 | 16 | C5F7 |
| Cloroformo:metanol 68-32% | 50-55 | 17-18 | C5F8 |
| Cloroformo:metanol 65-35% | 56-60 | 19-21 | C5F9 |
| Cloroformo:metanol 60-40% | 61-65 | 22-23 | C5F10 |
| Cloroformo:metanol 50-50% | 66-70 | 24 | C5F11 |
| Cloroformo:metanol 40-60% | 71-75 | 25-26 | C5F12 |
| Metanol 100% | 76 | 27 | C5F13 |
| | | 28-33 | C5F14 |

| | |
|-------|-------|
| 34-39 | C5F15 |
| 40-47 | C5F16 |
| 48-49 | C5F17 |
| 50-55 | C5F18 |
| 56-60 | C5F19 |
| 61-62 | C5F20 |
| 63 | C5F21 |
| 64 | C5F22 |
| 65 | C5F23 |
| 66-67 | C5F24 |
| 68-70 | C5F25 |
| 71-75 | C5F26 |
| 76 | C5F27 |

En la figura 13 se muestra la identificación de compuestos con un Rf similar al de Canferol empleando cromatografía de fase normal. Dichos compuestos fueron aislados en el fraccionamiento C2F9 y C2F15. En los carriles 3 y 4 se muestra la fracción C4F12 y C4F13 compuestos con un Rf de 0.44 mismo Rf presente en el estándar canferol 0.44 (flechas blancas). En los carriles 5 y 6 se muestran en la fracción C5F6 y C5F7. (Flechas rojas) compuestos con Rf similar al canferol (Recuadro azul). En la figura se puede observar que el canferol está significativamente desplazado entre los carriles 2 y 5-6.

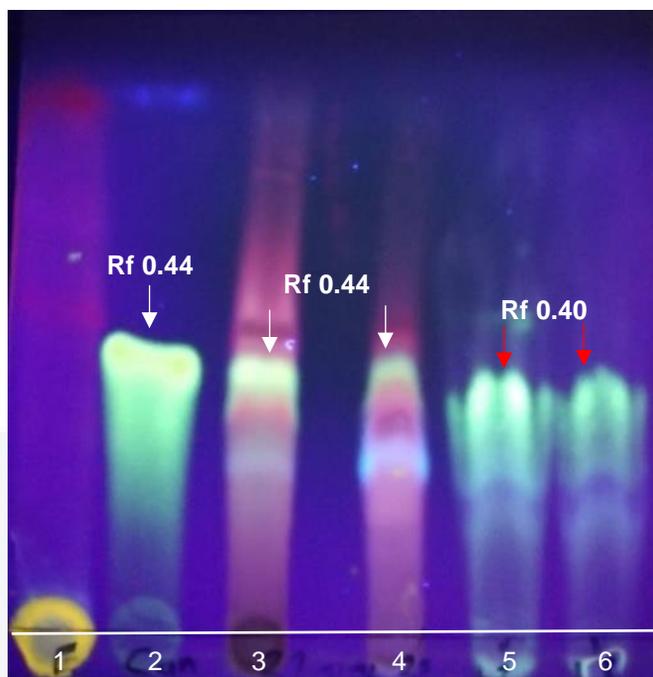


Figura 13. Cromatografía en Fase Normal de las Fracciones C2F9 y C2F15. Carriles:1 Extracto etanólico total, 2: estándar de canferol, 3: Fracción C4F12, 4: Fracción C4F13, 5: Fracción C5F6, 6: Fracción C5F7. Fase móvil cloroformo:metanol 90:10. Las flechas blancas señalan el mismo Rf de 0.44 presenta en canferol y las fracciones C4F12 y C4F13, las flechas rojas señalan el Rf de 0.40 de las fracciones C5F6 y C5F7.

7.6.6 Fraccionamiento 6 (C2F8, C2F9, C3F5)

En el fraccionamiento 6 se aislaron un total de 103 fracciones empleando un gradiente de cloroformo:metanol, las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 18 porciones tal como se muestra en la tabla 13. Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía FN, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de los Rfs de las bandas, con base en sus diferencias de polaridad. En la fracción C6F12 se identificó de manera cualitativa la presencia de compuestos fenólicos mediante cromatografía FR.

Tabla 13. Purificación de las Fracciones C2F8, C2F9 y C3F5, Fraccionamiento 6. Mediante gradiente cloroformo: metanol desde 100:0 hasta 0:100, dicho gradiente cambió con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase normal al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG. La fracción marcada corresponde C6F12 a secciones enriquecidas con compuestos fenólicos presentes en la fracción con actividad biológica C4F13.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas | Clave |
|---------------------------|----------|---------------------|--------------|
| Cloroformo 100% | 1-15 | 1-3 | C6F1 |
| Cloroformo:metanol 98-2% | 16-30 | 4-9 | C6F2 |
| Cloroformo:metanol 80-20% | 13-18 | 10-15 | C6F3 |
| Cloroformo:metanol 95-5% | 31-46 | 16-25 | C6F4 |
| Cloroformo:metanol 93-7% | 47-48 | 26-27 | C6F5 |
| Cloroformo:metanol 90-10% | 49-70 | 28-30 | C6F6 |
| Cloroformo:metanol 80-20% | 71-81 | 31-32 | C6F7 |
| Cloroformo:metanol 70-30% | 82-90 | 33-36 | C6F8 |
| Cloroformo:metanol 60-40% | 91-98 | 37-38 | C6F9 |
| Cloroformo:metanol 50-50% | 99-102 | 39-46 | C6F10 |
| Cloroformo:metanol 0-100% | 103 | 47-48 | C6F11 |
| | | 49-70 | C6F12 |
| | | 71-76 | C6F13 |
| | | 77-81 | C6F14 |

| | |
|--------|-------|
| 82-90 | C6F15 |
| 91-98 | C6F16 |
| 99-102 | C6F17 |
| 103 | C6F18 |

En la figura 14 se muestra la identificación de compuestos de con Rf similar a la fracción con actividad biológica C4F13, empleando cromatografía de fase normal, con una fase móvil cloroformo:metanol 70:30 . Dichos compuestos fueron aislados tras purificar la mezcla de las fracciones C2F8, C2F9, C3F5. En el carril 7 se muestra la migración de compuestos fenólicos de la fracción C6F12 con un Rf de 0.63, mismo Rf que presentaron los compuestos en el carril 2 correspondiente a la fracción C4F13, de igual Rf al estándar de canferol, al cual se le ha atribuido actividad analgésica.

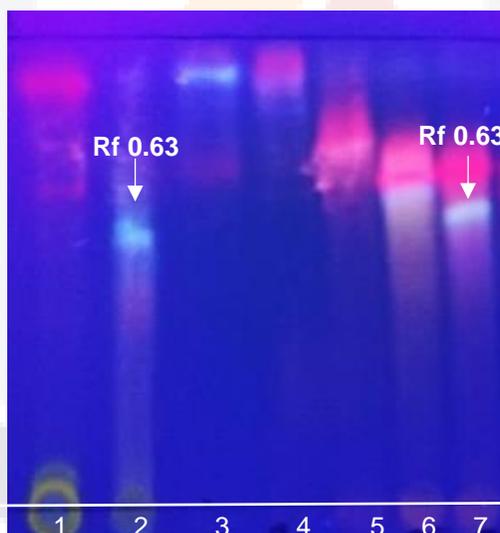


Figura 14. Cromatografía en Fase Normal de Mezcla de Fracciones (C2F8, C2F9, C3F5). Carriles:1 Extracto etanólico total, 2: Fracción C4F13, 3: Fracción C6F2, 4: Fracción C6F3, 5: Fracción C6F5, 6: Fracción C6F9, 7: Fracción C6F12. Fase móvil Cloroformo:metanol 70:30. Revelador NP/PEG. Las flechas blancas señalan la migración de canferol y la fracción C6F12 con un Rf de 0.63

7.6.7 Fraccionamiento 7 (C6F12 Fase Reversa)

En el fraccionamiento 7 se aislaron un total de 52 fracciones empleando un gradiente de agua: acetonitrilo, las fracciones que presentaron Rfs de migración similares se agruparon en 13 porciones tal como se muestra en la tabla 14. Con cada una de las fracciones se realizó un seguimiento mediante cromatografía FN, combinando aquellas en la cuales el revelado con NP/PEG mostró migración idéntica de los Rfs de las bandas, con base a sus diferencias de polaridad. En las fracciones C7F6 y C7F7 se identificó de manera cualitativa mediante cromatografía FR la presencia de compuestos fenólicos.

Tabla 14. Purificación de la Fracción C6F12, Fraccionamiento 7. Mediante gradiente agua:acetonitrilo desde 75:25 hasta 0:100, dicho gradiente cambió con base en la migración de los compuestos fenólicos en cromatografía de fase reversa al ser revelados a una longitud de onda de 250 nm y 325 nm con NP-PEG. Las fracciones marcadas C7F6 y C7F7 corresponden a secciones enriquecidas con compuestos fenólicos presentes en la fracción con actividad biológica C4F13.

| Sistema de elución | Fracción | Fracciones reunidas | Clave |
|--------------------------|----------|---------------------|-------------|
| Cloroformo 100% | 1-3 | 1-3 | C7F1 |
| Agua:acetonitrilo 75-25% | 4-9 | 4-9 | C7F2 |
| Agua:acetonitrilo 70-30% | 10-11 | 10-11 | C7F3 |
| Agua:acetonitrilo 65-35% | 14-24 | 12-13 | C7F4 |
| Agua:acetonitrilo 60-40% | 25-28 | 14-17 | C7F5 |
| Agua:acetonitrilo 50-50% | 29-32 | 18-24 | C7F6 |
| Agua:acetonitrilo 30-40% | 33-43 | 25-28 | C7F7 |
| Agua:acetonitrilo 20-80% | 44-45 | 29-31 | C7F8 |
| Agua:acetonitrilo 10-90% | 46-51 | 32 | C7F9 |
| Agua:acetonitrilo 0-100% | 52 | 33-43 | C7F10 |
| | | 44-45 | C7F11 |
| | | 46-51 | C7F12 |
| | | 52 | C7F13 |

En la figura 15 se muestra la purificación de compuestos mediante cromatografía en fase reversa, los cuales presentaron un Rf similar a la fracción con actividad biológica C4F13. Dichos compuestos fueron aislados tras purificar la fracción C6F12. En los carriles 3-7 se muestra la migración de compuestos fenólicos de las fracciones C6F6 y C6F7 (recuadro blanco), los cuales presentaron Rf de 0.30, mismo Rf que presentaron los compuestos en el carril 1 correspondiente a la fracción con actividad analgésica C4F13 que posteriormente mostró actividad analgésica en los ensayos biológicos.



Figura 15. Cromatografía en Fase Reversa de la Fracción C6F12. Carriles:1 Fracción C4F13, 2: Fracción C6F12, 3: Fracción 23, 4: Fracción 24, 5: Fracción 25, 6: Fracción 26, 7: Fracción 27, 8: Fracción 28. Fase móvil cloroformo:metanol 60:40. Revelador NP/PEG. El recuadro señala la purificación de fracciones con un Rf de 0.30.

7.7 Cromatografía Líquida de Alta resolución Acoplado a Masas HPLC-MS

En la figura 16 A se observa el perfil cromatográfico de la *P. sacharosa* cultivada en exterior y adicionada con una carga de vitexina en un tiempo de retención (TR) de 11.19 min y canferol-3-glucósido a un TR de 13.35 min. Ninguno de los dos compuestos se encuentra en la muestra, en la figura 16 B se muestra un pico con un TR de 9.81 del extracto total del *P. sacharosa* cuyo análisis fitoquímico arrojó una concentración de 110.81 mg g⁻¹ de peso seco. Sin embargo, este mismo perfil ubicado en la figura 16C fue reducido a un solo pico con un tiempo de retención de 21.12 min, tras realizar una hidrólisis ácida de la muestra con ácido clorhídrico 12 M por 6 h. Lo anterior sugiere que los compuestos detectados en la figura 16C corresponden a derivados de canferol, ya que el tiempo de retención es muy parecido al del propio estándar de canferol (TR 21.32 min, figura 16D), así como a sus máximos de absorbancia (figuras 16C-D). En la figura 16 E se observa que el ion pseudo molecular en m/z: 285.02 produjo fragmentos en m/z: 255 debido a la pérdida de oxígeno y una molécula de agua, y fragmentos en m/z: 153 y 151 debido a la fragmentación del anillo C.

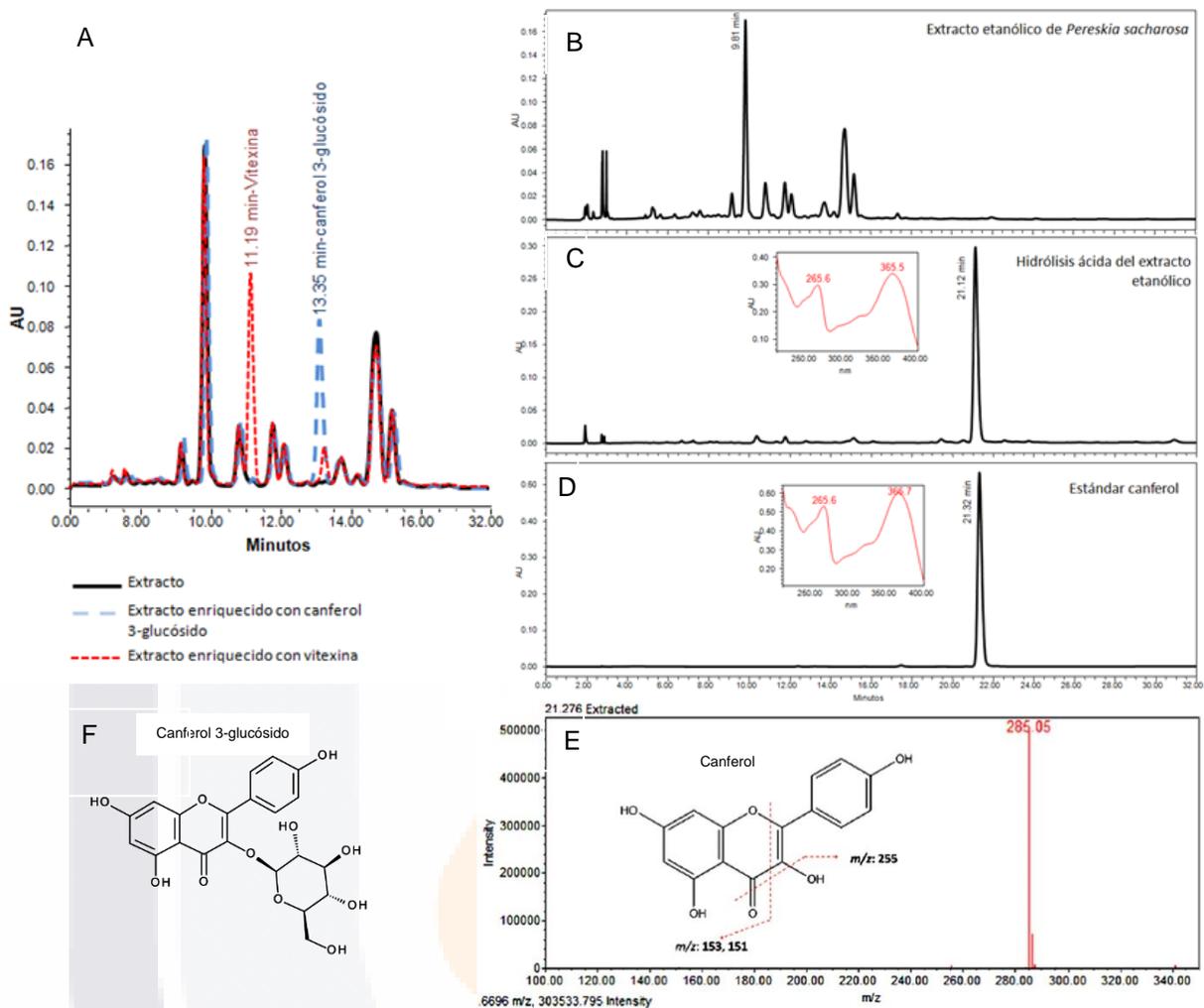


Figura 16. Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplado a Masas del Extracto Etanólico Total de *P. sacharosa* A) Perfil cromatográfico adicionado con vitexina y canferol-3-glucosido B) Perfil cromatográfico *P. sacharosa* ampliado C) Hidrolisis del extracto etanólico D) Estándar canferol. E) Espectrometría de masas de extracto etanólico hidrolizado de *P.sacharosa*. F) Canferol 3-gluopsido.

En la figura 17 se observa el perfil cromatográfico de las fracciones aisladas de *P. sacharosa* y empleadas en el ensayo biológico de actividad antinociceptiva. La figura 17A muestra el perfil de la fracción C1F6 el cual presentó TR de 1.6 min, 8.8 min y 9.18 min a una longitud de onda de 265 nm. La figura 17B muestra el perfil de la fracción C1F9 el cual presentó TR de 1.2 min, 1.8 min y 6.40 min a una longitud de onda de 265 nm.

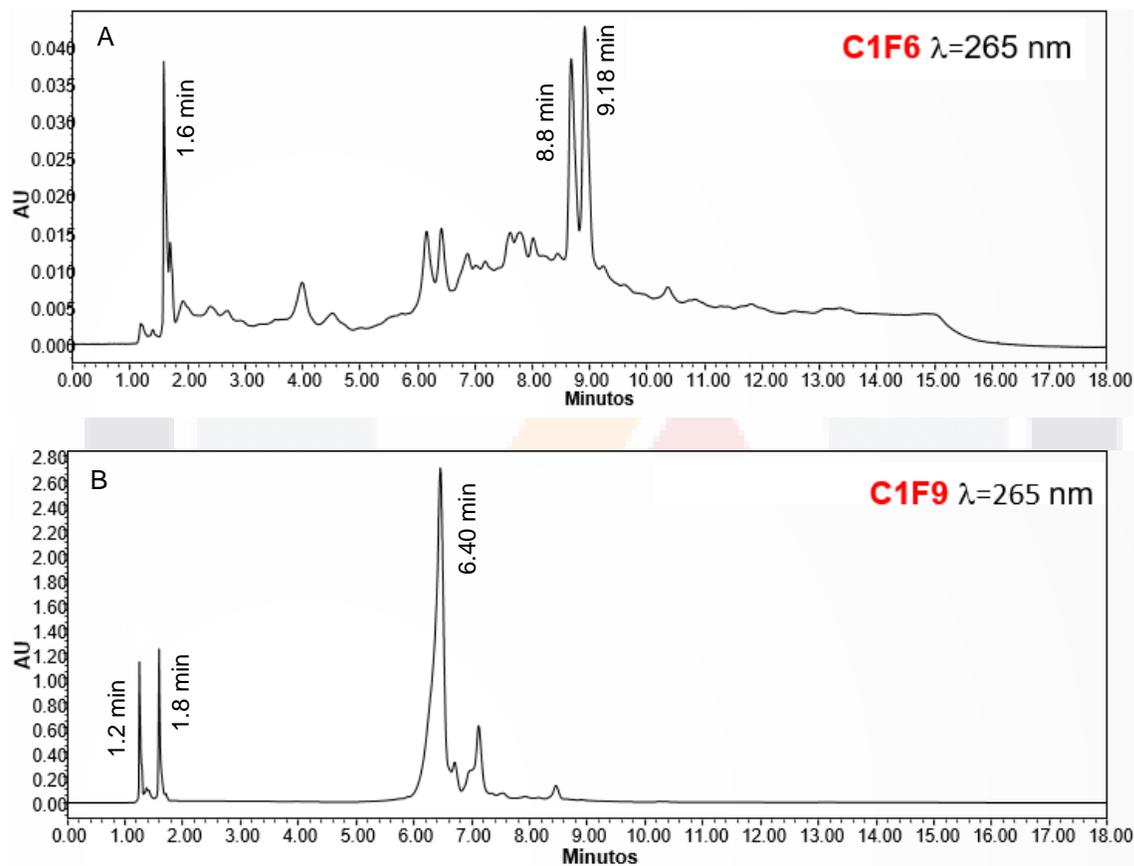


Figura 17. Cromatografía Líquida de Alta Resolución para de las Fracciones aisladas C1F6 y C1F9. **A)** Perfil cromatográfico C1F9. **B)** Perfil cromatografico C1F9.

7.8 Actividad Antinociceptiva

El modelo experimental de dolor inducido por formalina para evaluar la actividad antinociceptiva fue llevado a cabo con el objeto de determinar el efecto analgésico tanto del extracto etanólico como de las fracciones subsecuentes que contenían compuestos fenólicos, para establecer una dosis con actividad antiinflamatoria que pudiera ser aplicada posteriormente en el ensayo biológico con LPS. La figura 18 muestra una comparación inicial entre el extracto etanólico obtenido en invernadero a una dosis de 100 mg/kg, el extracto etanólico obtenido a la intemperie a una dosis de 100mg/kg, un vehículo que consistió en 50 micro litros de tween 80 al 0.2% en agua destilada, y un control positivo correspondiente a tramadol (fármaco de referencia del tipo opioide) a una dosis de 30 mg/kg. Se observó un efecto analgésico significativo con la dosis de 100 mg/kg del extracto etanólico obtenido de plantas cultivadas tanto en invernadero como a la intemperie. El análisis de varianza mostró que el efecto analgésico se hizo presente en la fase inflamatoria (20-25 mins), disminuyendo las lamidas en un 56.1% con el extracto de invernadero y en un 92.7% con el extracto a la intemperie (Fig. 18 B), mientras que las sacudidas disminuyeron un 57 y 74% respectivamente (Fig. 18 D), presentado un mayor efecto analgésico el extracto de hojas colectadas a la intemperie. Ninguno de los extractos presentó efecto significativo durante la fase neurogénica (Fig.18 A y C).

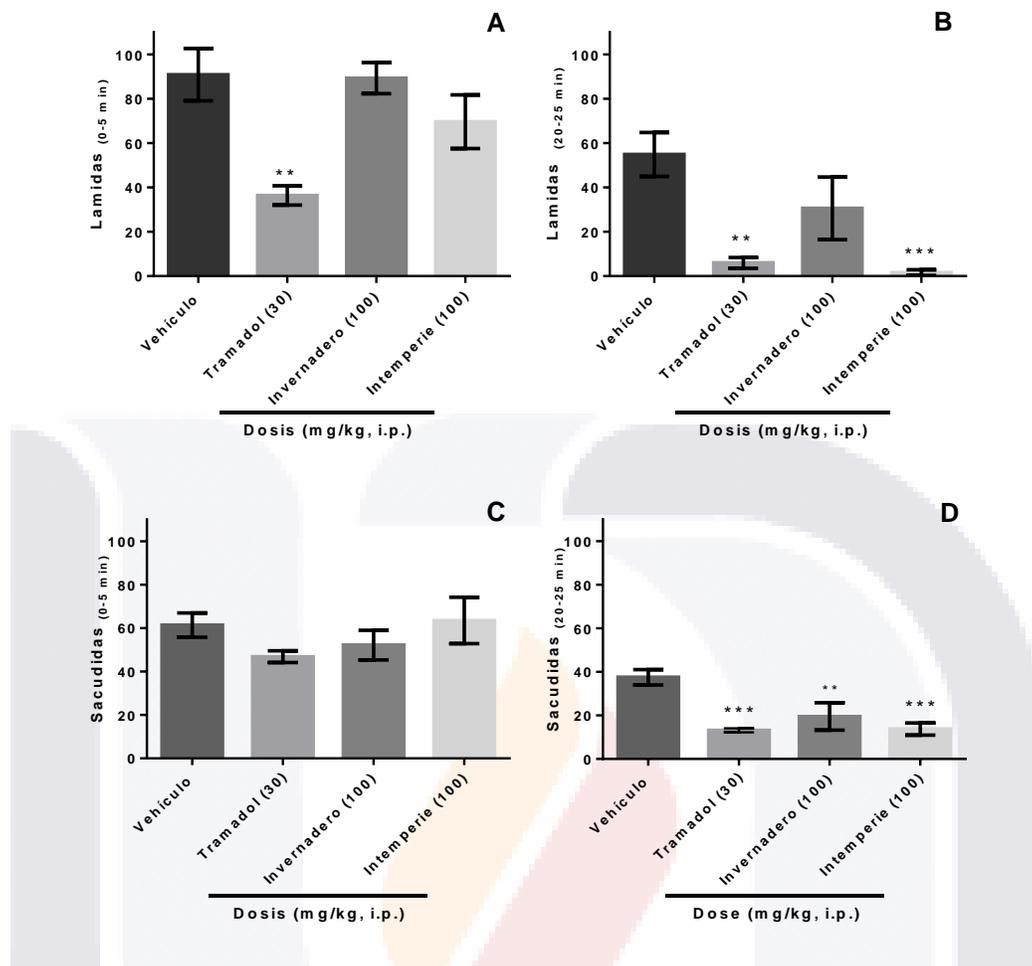


Figura 18. Evaluación de la Actividad Antinociceptiva del Extracto Etanólico de *P. sacharosa* en Ratones de la Cepa CD1. Vehículo (n=8), invernadero 100 mg/kg (n=6), intemperie 100 mg/kg (n=8) y tramadol 30 mg/kg (n=6) en el modelo de dolor inducido con formalina. Promedio \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de 1 vía *post-hoc* Dunnett. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. **A)** Fase neurogénica de lamidas, **B)** Fase inflamatoria de lamidas, **C)** Fase neurogénica de sacudidas, **D)** Fase inflamatoria de sacudidas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A partir del primer ensayo de dolor inducido por formalina, se seleccionó el extracto con mayor efecto analgésico correspondiente al obtenido de hojas colectadas a la intemperie.

La figura 19 muestra la comparación de la actividad antinociceptiva del extracto a la intemperie a menores dosis (10 y 30 mg/kg); fracciones del mismo extracto o de extracto a la intemperie aisladas ricas en compuestos fenólicos: C1F6, C1F9 y C4F13 (10 y 30 mg/kg); fármaco de referencia: tramadol (30 mg/kg); y vehículo (50 microlitros de tween 80 al 0.2% en agua destilada), evaluando el efecto antinociceptivo de los tratamientos tanto en la fase neurogénica como en la fase inflamatoria. El análisis de varianza demostró que el efecto analgésico se hizo presente en la fase inflamatoria (20-25 min) disminuyendo las lamidas y sacudidas como respuesta conductual ante el dolor. Para las lamidas (Fig. 19 B) se observó diferencia significativa tanto con las dosis de 30 mg/kg ($p < 0.001$), y 100 mg/kg ($p < 0.001$) de extracto, como con las fracciones C1F6 ($p < 0.01$), C1F9 ($p < 0.001$), Y C4F13 ($p < 0.001$). Para las sacudidas (Fig. 19 D) se observó diferencia significativa con las dosis de 10 mg/kg ($p < 0.001$), 30 mg/kg ($p < 0.001$) y 100 mg/kg ($p < 0.001$) de extracto, así como con las fracciones aisladas C1F9 ($p < 0.01$), y C4F13 ($p < 0.001$). Ninguno de los extractos y presentó efecto significativo durante la fase neurogénica, a excepción de la fracción C4F13 (Fig.19 A y C).

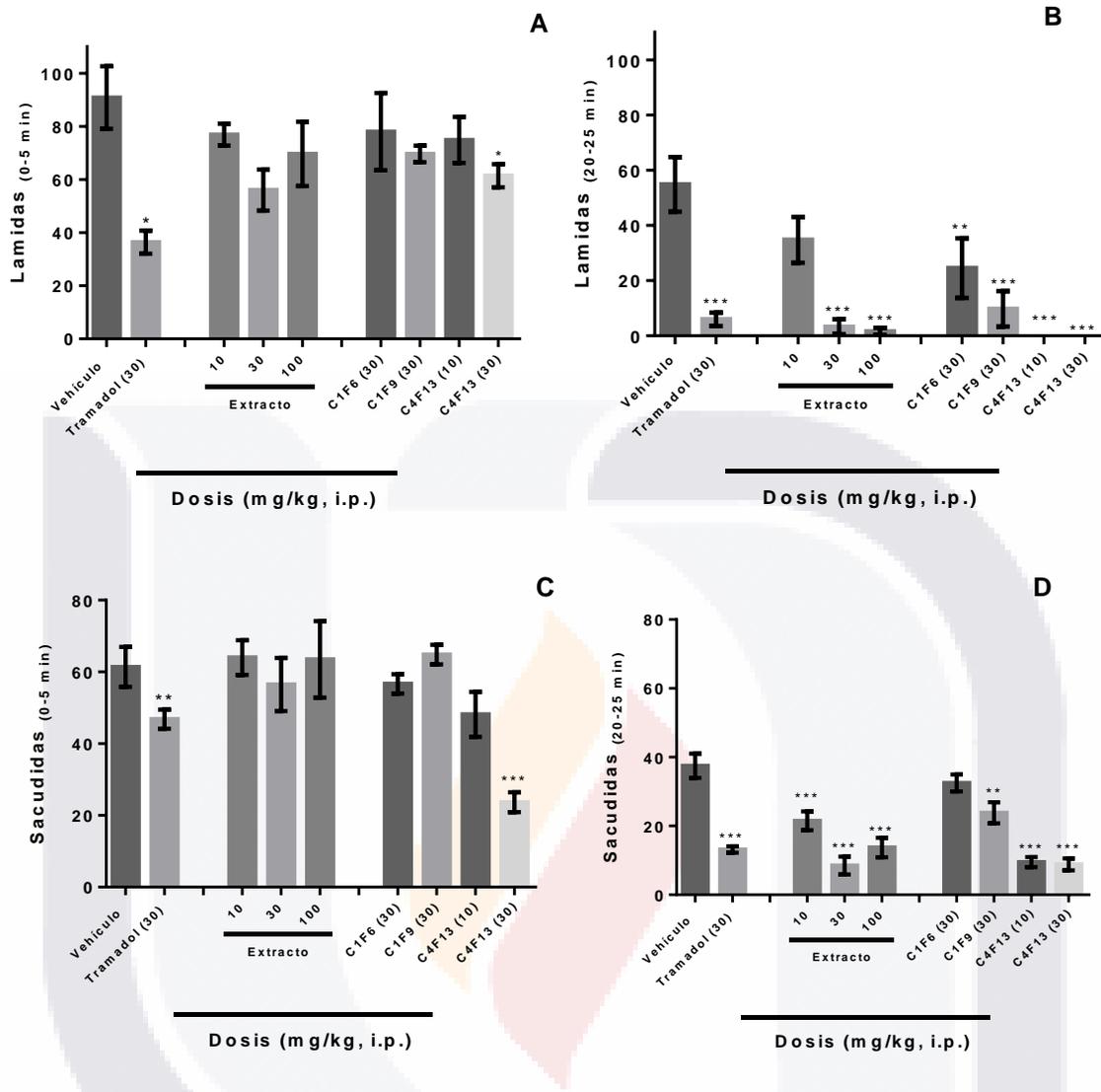


Figura 19. Evaluación de la Actividad Antinociceptiva del Extracto Etanólico y de las Fracciones Aisladas, en Ratones de la cepa CD1. Vehículo (n=8), 10 mg/kg (n=6), 30 mg/kg (n=6), 100 mg/kg (n=8), tramadol 30 mg/kg (n=6), fracciones aisladas; C1F6 30 mg/kg (n=6), C1F9 30 mg/kg (n=6), C4F13 10 mg/kg (n=6) y C4F13 30 mg/kg (n=6), en el modelo de dolor inducido con formalina. Promedio ± error estándar de la media. Análisis de varianza de 1 vía *post-hoc* Dunnett. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. **A)** Fase neurogénica de lamidas, **B)** Fase inflamatoria de lamidas, **C)** Fase neurogénica de sacudidas, **D)** Fase inflamatoria de sacudidas.

La figura 20 muestra la comparación de la actividad antinociceptiva de estándares comerciales como luteolina, apigenina, vitexina, canferol, canferol-3-Glucósido (5 mg/kg); antagonistas: naltrexona 1 mg/kg, WAY100635 0.32 mg/kg; coadministración de antagonistas con la fracción C4F13: naltrexona 1 mg/kg + C4F13 30 mg/Kg, flumazenil 1 mg/kg + C4F13 30 mg/Kg y WAY100635 + C4F13 30 mg/Kg; un fármaco de referencia de tipo opioide: tramadol (30 mg/kg); con respecto al control (50 microlitros de tween 80 al 0.2% en agua destilada), evaluando los mecanismo de acción de la fracción y el efecto antinociceptivo de los tratamientos tanto en la fase neurogénica como en la fase inflamatoria. El análisis de varianza demostró que el efecto analgésico se hizo presente en la fase inflamatoria disminuyendo las lamidas y sacudidas como respuesta conductual ante el dolor. Para las lamidas (Fig. 20 B) se observó una diferencia significativa con los estándares de luteolina ($p < 0.01$) y canferol-3-glucósido ($p < 0.01$). Para las sacudidas (Fig. 20 D) se observó una diferencia significativa con los estándares de luteolina ($p < 0.01$), apigenina ($p < 0.01$)- y canferol ($p < 0.05$).

En relación con los mecanismos de acción, la coadministración de los antagonistas con la fracción aislada mostró diferencia significativa ($p < 0.01$) para ambas respuestas conductuales. Ninguno de los extractos, estándares, y antagonistas en conjunto con la fracción aislada presentó efecto significativo durante la fase neurogénica (Fig.20 A y C).

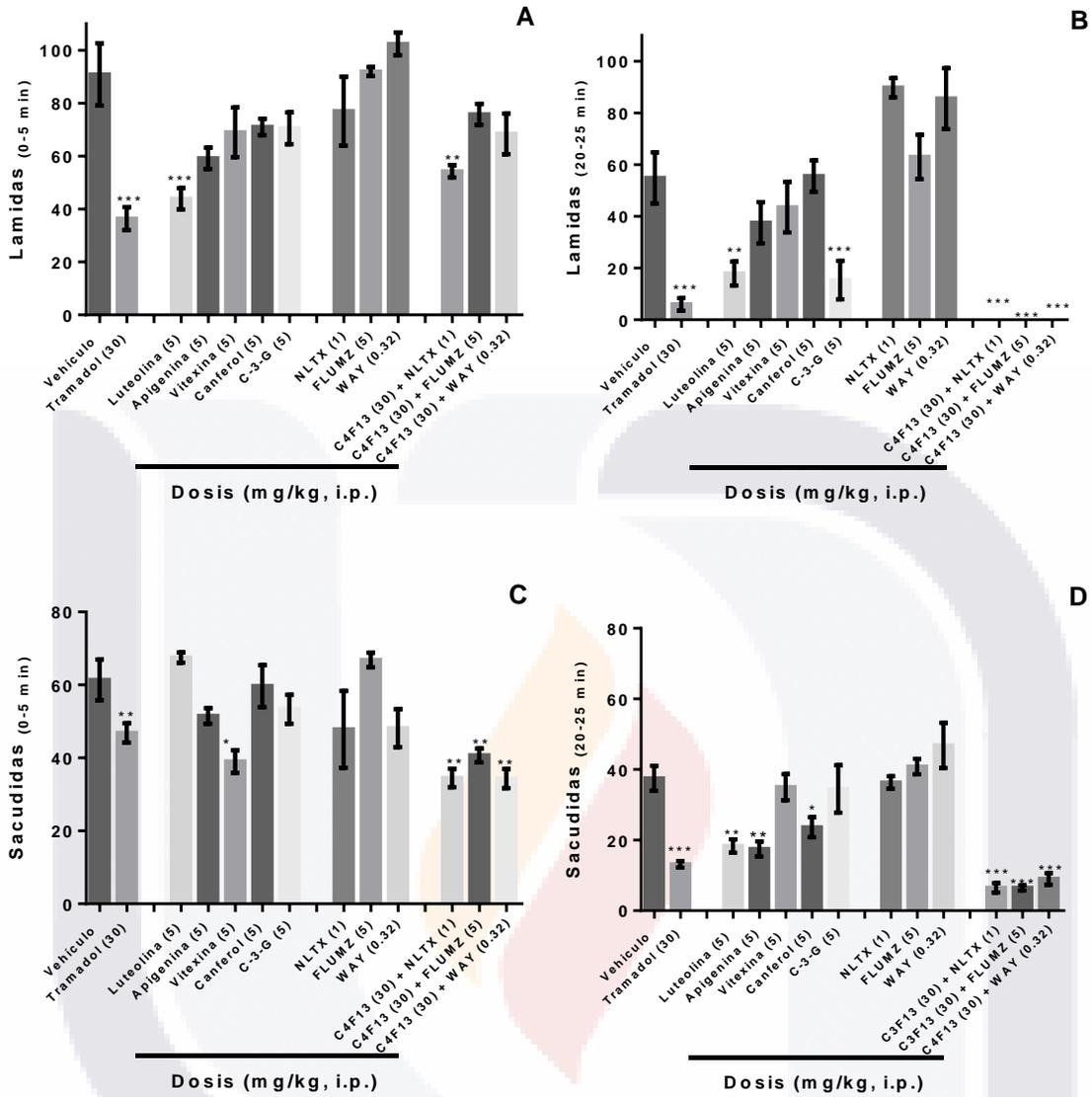


Figura 20. Evaluación de Actividad Antinociceptiva de Estándares y Entagónistas, en Ratones de la Cepa CD1. Vehículo (n=8), 10 mg/kg (n=6), 30 mg/kg (n=6), 100 mg/kg (n=8), tramadol 30 mg/kg (n=6), luteolina 5 mg/kg (n=6), apigenina (n=4), vitexina (n=4), canferol (n=6) y canferol-3-glucosido (n=6), antagonistas; naltrexona (antagonista opioide no selectivo), 1 mg/kg (n=6), WAY100635 (5-HT1A / antagonista del receptor a serotonina), 0.32 mg/kg (n=6), coadministración; naltrexona 1 mg/kg + C4F13, 30 mg/kg (n=6), flumazenil (antagonista del receptor a benzodiazepinas / GABAA), 5 mg/kg + C4F13, 30 mg/kg (n=3) y WAY1063, 0.32 mg/kg + C4F13, 30 mg/kg (n=6), en el modelo de dolor inducido con formalina. Promedio ± error estándar de la media. Análisis de varianza de 1 vía *post-hoc* Dunnett. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. **A)** Fase neurogénica para lamidas, **B)** Fase inflamatoria para lamidas, **C)** Fase neurogénica para sacudidas, **D)** Fase inflamatoria para sacudidas.

7.9 Cuantificación de Corticosterona

En la figura 21 se muestran los análisis de varianza de una vía de las cepas C57/BL6/JN y CD1, a las que se les administró el extracto etanólico de *P. sacharosa*, evaluando la concentración de corticosterona en sangre tras la exposición a LPS durante 3 y 9 horas. El análisis de comparación múltiple demostró que el efecto de *P. sacharosa* se hizo presente en la cepa CD1 al haber transcurrido 9 horas de exposición a LPS en conjunto a la administración previa del extracto etanólico, de manera que la concentración de corticosterona en sangre disminuyó significativamente, en comparación con el vehículo (Fig. 21B). El efecto inflamatorio del LPS estuvo presente en ambas cepas y fue significativo en los grupos con LPS 3H+P ($p < 0.01$), LPS 9H ($p < 0.05$) y LPS 9H+P ($p < 0.05$) de la cepa C57/BL6/JN y en los grupos LPS 3H ($p < 0.01$), LPS 3H+P ($p < 0.05$) y LPS 9H ($p < 0.05$) de la cepa CD1 (Fig. 21), siendo la cepa CD1 la que presentó una mayor sensibilidad al tratamiento con LPS (LPS 3H) y una disminución significativa en el efecto pro inflamatorio del LPS al ser pre administrada con el extracto de *P. sacharosa*. No se observaron diferencias significativas entre la concentración basal de corticosterona del grupo control con respecto al grupo LPS 9H+P (Fig. 21B).

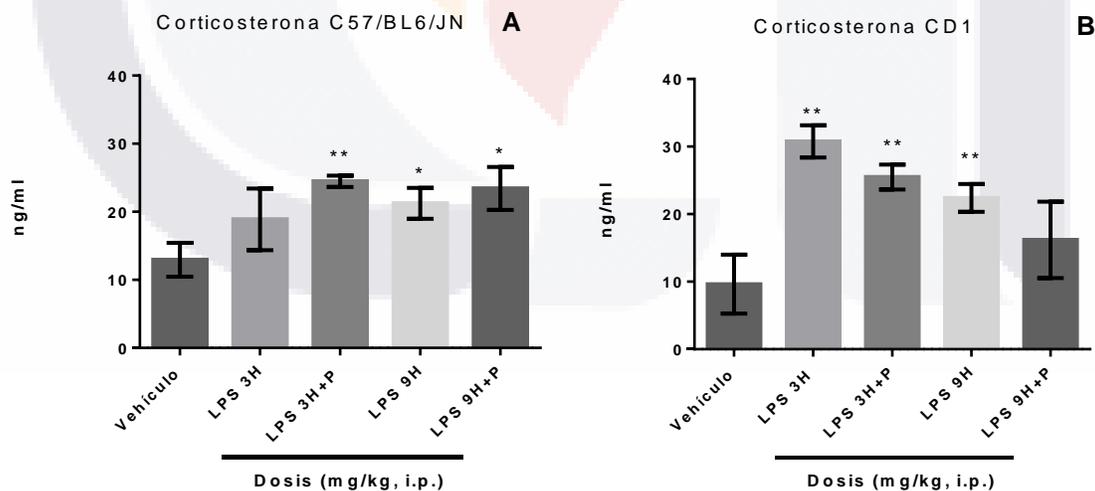


Figura 21. Cuantificación de Corticosterona en Sangre. Concentración [ng/ml] de corticosterona en sangre tras administración previa de extracto etanólico vía i.p. de *P. sacharosa* (100mg/kg), y exposición a LPS (2.5 mg/kg) de 3 a 9 horas, ($n \leq 10$) **A**) Cepa C57/BL6/JN, **B**) Cepa CD1. Promedio \pm error estándar de la media Análisis de varianza de 1 vía *post-hoc* Dunnett. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

7.10 Cuantificación de Interleucina-6

En la figura 22 se muestra un análisis de varianza de una vía de las cepas CD1 y C57/BL6/JN, a las que se les administró el extracto etanólico, evaluando la concentración de interleucina-6 (IL-6) en sangre tras la exposición a LPS durante 3 y 9 horas. El análisis de comparación múltiple demostró que efecto de *P. sacharosa*, es independiente del efecto de IL-6. La concentración de IL-6 en sangre, muestra un pico de actividad tras 3 hrs de administración con LPS, que disminuye notablemente a las 9 hrs de haber administrado LPS en ambas cepas, independientemente de la administración de *P. sacharosa* (Fig. 22 A-B) El efecto del LPS se observó en los grupos LPS 3H ($p < 0.01$), LPS 3H+P ($p < 0.01$) y LPS 9H ($p < 0.01$) de la cepa C57/BL6/JN, y en los grupos LPS 3H ($p < 0.001$), LPS 3H+P ($p < 0.001$), LPS 9H ($p < 0.01$) y LPS 9H+P ($p < 0.001$) de la cepa CD1.

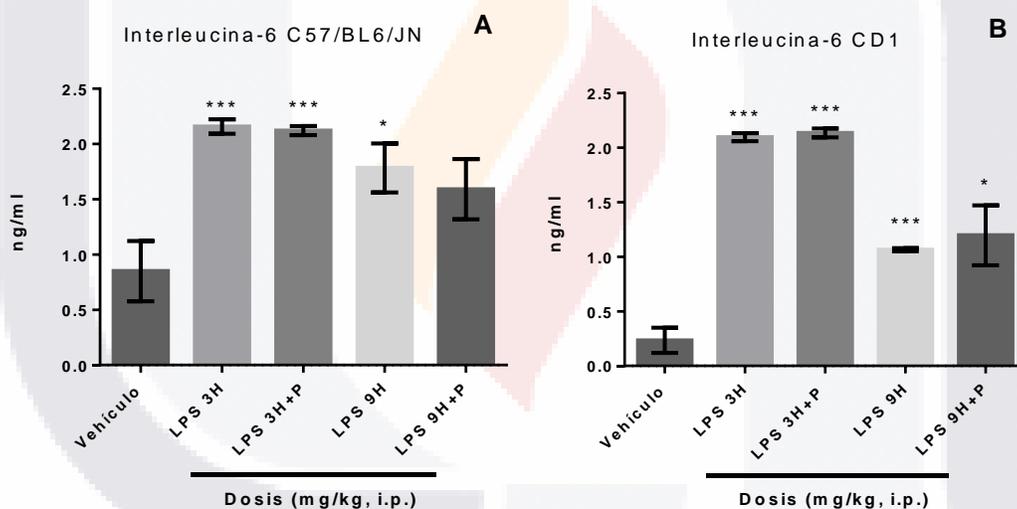


Figura 22. Cuantificación de Interleucina-6 (IL-6) en Sangre. Concentración [ng/ml] de IL-6 en sangre tras administración previa de extracto etanólico vía i.p. de *P. sacharosa* (100mg/kg), y exposición a LPS (2.5 mg/kg) de 3 a 9 horas, ($n \leq 10$) **A)** Cepa C57/BL6/JN, **B)** Cepa CD1. Promedio \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de 1 vía *post-hoc* Dunnett. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

7.11 Análisis Microscópico de Epifluorescencia y Microscopía Confocal

En la figura 23 se muestra un análisis cualitativo empleando microscopía de epifluorescencia y confocal, en la cual se puede observar la emisión de fluorescencia intrínseca de metabolitos secundarios presentes en extracto de *P. sacharosa*, a varios aumentos y distintas longitudes de onda. El análisis de microscopía de epifluorescencia muestra fluorescencia roja que es emitida tras ser expuesto a filtro rojo lejano: (**Figs. A, B, C, D, G**), distinta a la fluorescencia emitida por los flavonoides en el espectro UV. Empleando el filtro DAPI a 358 nm se observa una emisión de fluorescencia blanco-azuladas específica de flavonoides: **Figs. E, H** mismos campos que **Figs. D y G**. Mientras que, en las **Figs. F, I** empleando microscopía confocal se observa la misma tonalidad fluorescente que presenta en un corte de cerebro de roedor tras la administración en conjunto de extracto de *P. sacharosa* y LPS. Las flechas negras muestran el tercer ventrículo uno de los sistemas de distribución de fluido cerebro espinal del cerebro, y las flechas blancas indican como dicho sistema distribuyó el extracto etanólico de *P. sacharosa* a través de la eminencia media o piso del tercer ventrículo.

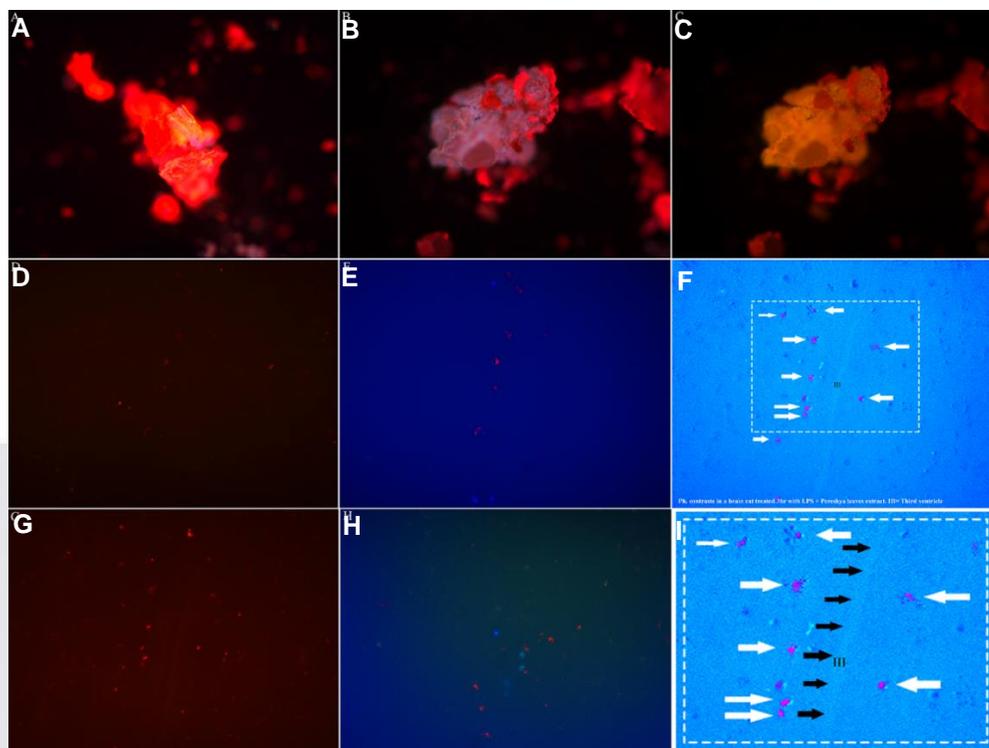


Figura 23. Análisis Histológico de Cerebro de Roedor tras Ensayo de LPS. **A, B, C)** Extracto etanólico visto al microscopio directamente con filtro rojo lejano (microscopía de epifluorescencia) **D,G)** Extracto etanólico en el mismo campo a distinto aumento, **E,H)** Mismos campos E y G vistos con filtro DAPI (microscopía de epifluorescencia) **F,I)** Posibles compuestos fenólicos de extracto etanólico que atraviesan la eminencia media del cerebro de los ratones tras administración conjunta de *P. sacharosa* y LPS ,visto con filtro DAPI (microscopía confocal). Las flechas negras apuntan al tercer ventriculo y las blancas al extracto etanólico de *P. sacharosa*.

En la figura 24 se observan las secciones coronales de tejido cerebral para el análisis histológico, corroborando la presencia de flavonoides en el cerebro de ratones que recibieron tratamiento con el extracto etanólico, fracción bioactiva C4F13, estándar canferol y vehículo, en el ensayo de actividad antinociceptiva. Para ello, en primer lugar, se colocó una gota del extracto etanólico en un portaobjetos y se observó al microscopio de epifluorescencia con filtros de emisión de 340-380 y 425 nm (**Figs. A y B**, respectivamente). Mediante microscopía de epifluorescencia se observa emisión en las secciones coronales alrededor de Bregma -0.58 mm a -1.94 mm de ratones administrados con el extracto crudo de *P. sacharosa* en el borde del cerebro y en la arteria carótida interna (icta) respectivamente (**Figs. C, E**), con la fracción aislada C4F13 se observó la fluorescencia en el tercer ventrículo dorsal y ventral (**Figs. H, I**), de igual manera con el estándar de referencia canferol en el tercer ventrículo dorsal-ventral y en el núcleo arcuato hipotalámico (**Figs. J, K**). La

Fig. G muestra la posición en el cerebro del tercer ventrículo dorsal y ventral, en una vista panorámica de una sección coronal obtenida mediante microscopía confocal. Mientras que, en las **Figs. D, E** se observó una cantidad significativa de partículas las cuales emitían fluorescencia ubicadas en el borde del cerebro (barrera hematoencefálica). Se observó que estas partículas no solo están presentes en el tercer ventrículo dorsal del cerebro de los ratones que recibieron el extracto (no se muestra), sino también en aquellos a los que se administró la fracción purificada C4F13 (**Figs. H, I**) y el estándar canferol de referencia (**Fig. J, K**), lo que confirma que la presencia de flavonoides se originó a partir de *P. sacharosa* en el mismo lugar del cerebro de los animales. Por otro lado, una sección coronal de un ratón que recibió el vehículo no presentó ninguna fluorescencia en el tercer ventrículo dorsal (ni en ninguna otra área) (**Fig. F**). La fluorescencia no solo se hizo presente en el tercer ventrículo ventral (IIIIV) **Fig. I, K** sino también en las áreas cercanas, como es la arteria carótida interna (icta) (**Figs. D, E**); mediante la emisión de fluorescencia que indica la presencia de los componentes del extracto que aún no ingresan al cerebro tal como se observa en la **Fig. E** y de manera similar en la **Fig. C**.

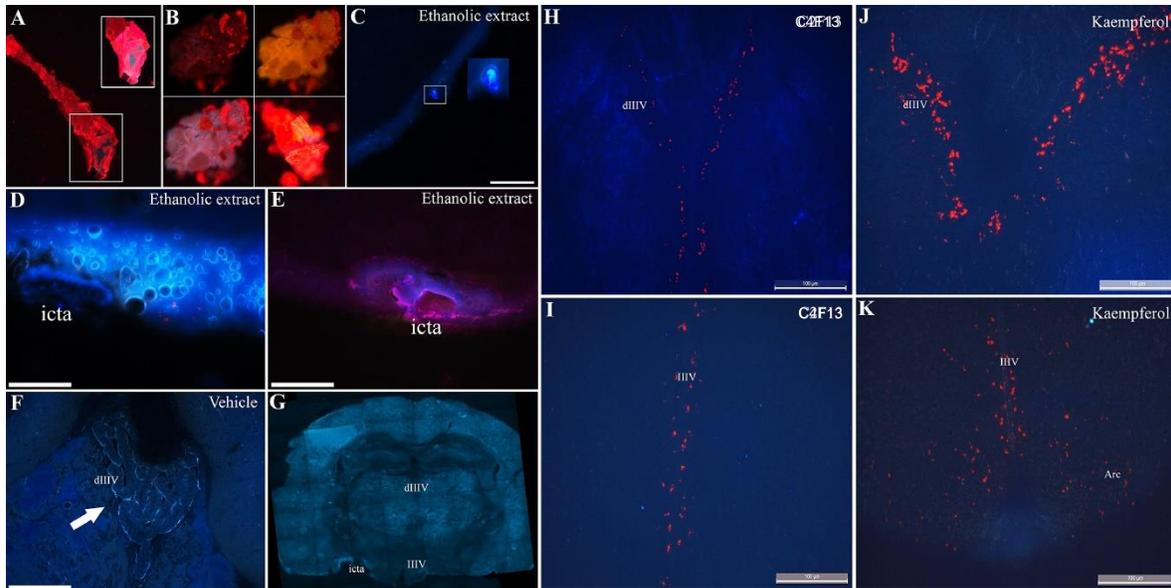


Figura 24. Análisis Histológico de Cerebro de Roedor tras Ensayo de Actividad Antinociceptiva. **A, B)** Gota de extracto etanólico de *P. sacharosa* bajo un microscopio de epifluorescencia con filtros de excitación y emisión= 340-380/425 nm, respectivamente. **C)** Emisión de Fluorescencia (azul) de extracto etanólico ubicado en el borde del cerebro (recuadro), **D, E)** Emisión de Fluorescencia (azul) en la arteria carótida interna (icta), y en los ventrículos cerebrales (no mostrados), **H, I)** Emisión de fluorescencia roja de la fracción purificada C4F13 empleada en ensayo de actividad antinociceptiva, en tercer ventrículo dorsal y ventral, **J, K)** Emisión de fluorescencia roja correspondiente a estándar de referencia (canferol) empleado en ensayo de actividad antinociceptiva, en tercer ventrículo dorsal y ventral, y núcleo arcuato hipotalámico, **F)** Fluorescencia no emitida tras la administración del vehículo (tween 80 al 0.2%) vía intraperitoneal, empleado en ensayo de actividad antinociceptiva, en tercer ventrículo dorsal, **G)** Vista panorámica de una sección coronal de cerebro de roedor obtenida mediante microscopio confocal LSM 900-airyscan 2 y un software Zen blue 3.1, que muestra la posición de la arteria carótida interna (icta), el tercer ventrículo dorsal (dIIIV) y ventral (IIIV), y el núcleo arcuato hipotalámico (Arc). Barra de escala en C= 100 um; D-F= 50 um. Todas las imágenes fueron obtenidas a las 3 horas posteriores a la administración de cada compuesto.

8. Discusión

8.1 Micropropagación

El esquema de micropropagación permitió la adaptación gradual de las plántulas generadas *in vitro*, haciéndolas capaces de superar las condiciones de invernadero y exteriores (Fig. 3). La generación de brotes a partir de meristemos axilares o apicales, y enraizamiento, empleando citoquininas y auxinas para inducir la formación de plántulas completas, se ha propuesto como una alternativa en el cultivo de tejidos para obtener una gran cantidad de organismos con el mismo genotipo, esto mediante la micropropagación. Dichos reguladores intervienen en los procesos de inducción y diferenciación celular (Raven y col., 1992). Los explantes *P. sacharosa* presentaron respuesta exitosa a los tratamientos con citoquininas y auxinas (Tabla 6), debido a que entre más diferenciado sea un tejido más difícil será su adaptación y respuesta *in vitro*, sin embargo, gracias a la metodología propuesta por Galván (2016) fue posible llevar a cabo el esquema completo de micropropagación.

La tasa de supervivencia fue del 100% (tabla 6). Partiendo de 30 explantes para la etapa 1, se usó 6-bencilaminopurina (BA, 6.66 μM) durante 45 días de cultivo *in vitro*, y se indujeron 7 ± 0.643 brotes / explante (Fig. 3A y B). Las citocinas son responsables de la estimulación, división y diferenciación celular, desencadenando procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas; desarrollo de cloroplastos, fotosíntesis, expansión de cotiledones (Condemarín-Montealegre y col., 2007) y formación de yemas después de la ruptura de la latencia a través de la proliferación axilar, un efecto reportado en cultivos complementados con bencilaminopurina (Santacruz Ruvalcaba y col., 2018). En especies del género *Pereskia*, se ha descrito la ruptura de la latencia de los brotes axilares utilizando 6-bencilaminopurina. Mauseth (1979), inhibió el dominio apical al romper la latencia de los brotes axilares, midiendo el efecto de este regulador para la inducción de brotes basados en diferentes tratamientos desde 1 mg-L hasta 10 mg-L en medio MS. A través de este esquema fue posible el establecimiento de la fase de multiplicación y dilucidar los

factores que determinan el crecimiento de las areolas que promueven la proliferación de brotes en la parte basal de *P. aculeata*.

En la etapa 2, se empleó el ácido indol butírico (IBA, 9.84 μM) durante 45 días de cultivo *in vitro* (Fig. 3C), se indujeron 6 ± 0.587 raíces / explante (Tabla 6). Las auxinas juegan un papel vital en la expansión de la pared celular y el desarrollo de las plantas al promover la división celular, proliferación, expansión y alargamiento. Estas hormonas estimulan la producción de factores de transcripción en la pared celular, que se unen a los promotores de genes que regulan el crecimiento celular extenso, las auxinas promueven la síntesis de proteínas THX, el efecto de estas genera raíces alargadas, que acumulan auxinas, y permiten la estimulación de la rizogénesis (Majda y Robert, 2018). El AIB promueve el desarrollo de enraizamiento en la etapa temprana de crecimiento, induce el alargamiento celular en las células de la raíz y promueve el dominio apical en la familia cactácea (Condemarín-Montealegre y col., 2007; Amador-Alfárez, y col., 2013).

De acuerdo con Pérez Molphe y col., 1999, los reguladores de crecimiento vegetal presentan distintos efectos en el estado morfológico y en el desarrollo del tejido en función de la especie. Este efecto depende en gran medida del estado fisiológico particular de dicho tejido, así como el de su origen y los tipos celulares presentes en el mismo. La respuesta del tejido se da por distintas condiciones, ya sean fisiológicas, morfológicas o genéticas, que permiten la interacción determinada por la sensibilidad entre los receptores específicos con los reguladores de crecimiento vegetal determina el desarrollo.

8.2 Aclimatación

Una vez concluida la etapa de micropropagación se llevó a cabo a la aclimatación de plántulas completas generadas *in vitro* en invernadero y el subcultivo a la intemperie mediante la propagación por esquejes (Fig. 4), obtenido un 100% de sobrevivencia de los organismos tanto en invernadero como a la intemperie. En la etapa 3, se empleó Peat moss: tierra vegetal: vermiculita (1: 1: 1) como sustrato, después de 6 días de adaptación en invernadero se indujeron 5 ± 0.643 brotes y 10

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

± 0.742 raíces / explante (Tabla 6), con una tasa de supervivencia del 100%. generando plántulas completas (Fig. 4 A y B). Los métodos de aclimatación varían de especie a especie, sin embargo, aun cuando se desconozcan las características específicas, se puede llevar a cabo el proceso acostumbrando a la planta al ambiente exterior y permitiendo que haya una correcta adaptación y crecimiento. Un proceso sencillo, si se siguen los protocolos y medidas adecuados (Martínez y col., 2005).

Posteriormente, en la etapa 4, se plantaron 15 segmentos nodales en macetas a la intemperie (Fig. 4C y D) y después de 6 días, se indujeron 9 ± 0.632 brotes y 14 ± 0.730 raíces / explante, con una tasa de supervivencia del 100% (Tabla 6). Tras la aclimatación al invernadero, la propagación por segmentos nodales permitió la adaptación de *P. sacharosa* al exterior, aumentando la población después de la micropropagación: 30 plantas completas de invernadero y 15 plantas completas a la intemperie. Este esquema implementado de propagación por segmentos nodales mostró una tasa de supervivencia del 100% de las 15 plantas exteriores completas en la etapa 4, de la misma manera el sustrato (Peat moss®-tierra vegetal-vermiculita) permitió la formación de brotes y raíces en una tasa de 9 ± 0.632 y 14 ± 0.730 respectivamente (Tabla 6). Se presentó una respuesta similar en los protocolos de adaptación de segmentos nodales de *P. aculeata*, Carvalho y col., 2014, evaluaron el desarrollo fisiológico de los segmentos nodales adaptados a diferentes sustratos durante 15 días, mostrando altas tasas de brotación, enraizamiento y adaptación a la intemperie con tierra vegetal y arena como sustrato.

La aclimatación es un proceso que se debe de llevar a cabo de manera gradual disminuyendo la humedad relativa, ya que las plantas generadas *in vitro* carecen de sistemas funcionales para evitar la pérdida de agua debido a la presencia de estomas atrofiados. Este proceso debe de ser lo más lento posible, reduciendo la humedad dentro y fuera del recipiente de cultivo para permitir el desarrollo paulatino de sistemas de protección de la planta contra la desecación, activación de sistemas fotosintéticos, generación de mecanismos de defensa contra patógenos y

adaptación en el intercambio de gases entre la atmósfera interior y la atmósfera (Pérez Molphe y col., 1999).

8.3 Procesamiento de Extractos

Después de la maceración de los extractos, se determinó su rendimiento en relación con el peso de la biomasa seca (Tabla 7). El extracto hexánico presentó el menor rendimiento de 8.25 mg de extracto / g de masa seca, mientras que los extractos clorofórmicos y metanólicos mostraron un mayor rendimiento: 206.04 y 534.86 mg de extracto / g de masa seca, respectivamente, debido a su alta composición. El extracto etanólico (188.45 mg de extracto / g de masa seca) se seleccionó debido a la presencia de compuestos fenólicos, estos compuestos se evaluaron por cromatografía en capa fina, usando NP / PEG como revelador (Fig. 5). Este reactivo permite detectar ácidos fenólicos, flavonoides y sus glucósidos, mediante la emisión de fluorescencia a 365 nm, y la presencia de sistemas aromáticos conjugados en su composición, mostrando colores que varían entre amarillo, naranja y verde (Debenedetti, 2009).

Cartaya y Reynaldo (2001) establecen que los compuestos como los flavonoides pueden extraerse indiscriminadamente debido a la solubilidad que tienen en diferentes solventes orgánicos polares, pudiendo encontrar estos metabolitos polares y glicosilados. Venegas (2012), afirma que la solubilidad de los flavonoides depende de la forma en que se encuentran y del número y clase de sustituyentes presentes; estos compuestos tienen una gran cantidad de grupos hidroxilo que forman glucósidos que son solubles en agua y alcohol, mientras que las agliconas altamente hidroxiladas son solubles en alcohol. Estos compuestos presentan actividad farmacológica que justifica el uso popular de especies dentro del género *Pereskia* (Abdul-Wahab y col., 2012).

Los flavonoides poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares; son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua. Por el contrario, los extractos no polares como el hexánico generalmente

contiene clorofilas, gomas, agliconas de flavonoides altamente metoxiladas como quercetina 3,7, 3', 4' tetrametil éter, y 6-metoxiquercetina 3,7, 3', 4' tetrametil éter, que son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo. Compuestos que no se hicieron presentes tras su revelado a 250 y 325 nm en el fraccionamiento y purificación de las secciones aisladas.

En las plantas, los flavonoides pueden encontrarse como flavonoides glicósidos, en los que más de un grupo hidroxilo del núcleo se encuentra conjugado a azúcares, de manera que la glicosilación de dichos metabolitos permite que estos sean menos reactivos y presenten mayor solubilidad en solventes polares. La glucosa es el monosacárido que generalmente está presente en los flavonoides conjugados, sin embargo, se pueden encontrar otro tipo de monosacáridos como la galactosa, ramnosa, xilosa, y el disacárido rutinosa. Dichos monosacáridos también pueden unirse al núcleo del flavonoide por enlaces carbono-carbono, con la diferencia de que el ataque se realiza sólo a las posiciones 6 y 8 del núcleo del flavonoide (Cartaya y col., 2001).

8.4 Cromatografía en Capa Fina y Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides

La cromatografía en capa fina de extractos totales procesados muestra la presencia de flavonoides en el extracto etanólico y metanólico (Fig. 5), empleando el revelador de productos naturales NP/PEG; este reactivo permite detectar compuestos fenólicos, así como ácidos fenólicos, flavonoides y sus glicósidos (Wagner y col., 1996).

Mediante curvas de calibración de ácido gálico y quercetina se determinó la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides (Figs. 6 y 7) a partir de extractos etanólicos de hojas de *P. sacharosa*. Se obtuvo una concentración correspondiente a 23.75 ug equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa seca y 3080.73 ug equivalentes de quercetina por g de biomasa seca. Macías (2017) evaluó estos mismos compuestos empleando las curvas de calibración correspondientes a ácido gálico y quercetina en extractos metanólicos de hojas de

P. sacharosa, y de *P. aculeata*. *P. sacharosa* presentó un total de 26.99 ug GA/g de biomasa seca, y 235.3 ug Q/g de biomasa seca, y *P. aculeata* presentó un total de 16.4 ug GA/g de biomasa seca, y 566.67 ug Q/g de biomasa seca. De igual manera que en el presente estudio la concentración de flavonoides fue mayor que la de compuestos fenólicos en ambas especies. Esto podría deberse a que el cloruro de aluminio genera una reacción nucleofílica directamente con el grupo amino (Klages, 1968); y como se mencionó anteriormente algunas especies del generó *Pereskia* presentan alto potencial aminoacídico, como es el caso de *P. aculeata* la cual tiene una constitución alta de aminoácidos esenciales correspondientes a lisina y triptófano (*de Castro y Scio, 2014*).

El cloruro de aluminio es esencial para la cuantificación de flavonoides; sin embargo, al igual que otros métodos espectrofotométricos, como es al emplear el reactivo Folin-Ciocalteu para cuantificar compuestos fenólicos puede ser inespecífico e interaccionar con otras moléculas como azúcares, presentes en los extractos vegetales, que pueden alterar los resultados encontrados (Núñez-Gastélum, 2017).

8.5 Fraccionamientos

Mediante los fraccionamientos 1-6 en fase normal fue posible identificar la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en el extracto etanólico. Empleando gradientes de polaridad (cloroformo:metanol) se llevó a cabo la separación de compuestos, debido a la solubilidad que presentan en diferentes solventes orgánicos, siendo posible encontrar metabolitos de naturaleza polar y glicosilado; obteniendo un total de fracciones distintas agrupadas en las tablas 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Las cuales con base en la polaridad y R_f de compuestos similares se fueron concentrando, y revelando con NP/PEG mediante cromatografías en fase normal, hasta encontrar las fracciones enriquecidas en las cuales se hicieron presentes los compuestos de interés (C1F6, C1F8 y C4F13), para posteriormente ser evaluados en ensayos de actividad antinociceptiva.

Empleando las fracciones (C1F6, C1F8 y C1F9) aisladas en el fraccionamiento 1, se procedió a realizar el revelado para flavonoides aplicando estándares

comerciales en cromatografía en capa fina en fase normal y fase reversa (Fig. 9). Dando como resultado en la CCF de fase normal, fluorescencia de color verde que migró con un R_f 0.65 similar al de la apigenina, empleando una fase móvil cloroformo:metanol 85:15 (Fig. 9A). La elución con estos solventes permite a la migración y extracción de flavonas 5, 7, 4' hidroxiladas (Col y Abdala, 2005), y la presencia de fluorescencias de color amarillo en los puntos de aplicación de las fracciones y el extracto etanólico total (Fig. 9 A-C). Mientras que, en la CCF de fase reversa, principalmente en la fracción enriquecida (C1F9), se hicieron presentes fluorescencias de color amarillo y naranja (Fig. 9D); mediante esta CCF se realizó la separación entre dichos compuestos totales mostrando una fluorescencia naranja similar a la estándar rutina con un R_f de 0.51.

La identificación de flavonoides empleado el revelador de productos naturales permitió la detección de compuestos fenólicos, flavonoides y sus glicósidos, esto gracias a la emisión de fluorescencia a 365 nm, debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados en su composición, mostrando colores que varían entre el amarillo, anaranjado y verde; estas coloraciones fueron observadas al realizar los fraccionamiento 2, a partir del cual fue posible purificar fracciones enriquecidas con compuestos fenólicos (C2F8, C2F9 y C2F15) los cuales presentaron en su mayoría tonalidades blanco-azuladas correspondientes a ácidos fenólicos (Fig. 10A), amarillas y anaranjadas correspondientes a flavonoides (Fig. 10 B-C).

A partir de las fracciones enriquecidas C2F8, C2F9 y C2F15, se llevó a cabo un refraccionamiento de cada una, los cuales nos permitieron aislar, purificar y mezclar compuestos fenólicos, como ya se mencionó anteriormente; mediante CCF fue posible identificar de manera cualitativa bandas blanco-azulada (Figs. 11, 12, 13 y 14), mostrando mismo R_f de migración y coloración que se hace presente en el estándar canferol un flavonol el cual se ha demostrado su presencia en algunas especies del género *Pereskia* como es en el caso de *P. bleo* y *P. grandifolia*, este metabolito puede estar presente como aglicona o conjugado a un glucósido, (Richardson, 1978). Este metabolito se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en ambas conformaciones y presenta potencial bioactivo, como es

efecto antitumoral, antioxidante, antiinflamatorio y anti proliferativo en células cancerígenas (Wang y col., 2018).

El análisis cromatográfico en capa fina permitió purificar compuestos fenólicos correspondientes a las fracciones C1F6, C1F9 y C4F13; las cuales presentaron una coloración amarillo-verdosa que es característica de los flavonoles con grupos 3-OH sustituidos, como la quercetina y el canferol, esta coloración también se puede observar cuando hay presencia de grupos mono hidroxilados en el anillo B, como es el caso del canferol, vitexina y apigenina (Coll y Abdala, 2005). Dicha coloración y migración de compuestos se presentó en el fraccionamiento 7 y CCF en fase reversa (Tabla 14) al comparar las fracciones aisladas C7F6 y C7F7 con la fracción C4F13 (Fig. 15), las cuales presentaron el mismo Rf de migración al estándar canferol y la fracción C4F13 evaluada en el ensayo de actividad antinociceptiva.

8.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Masas HPLC-MS

P. sacharosa es una cactácea con usos etnobotánicos en Sudamérica principalmente por sus efectos analgésico y antiinflamatorio, su compendio metabólico no se ha descrito. Sin embargo, en otras especies dentro de este mismo generó se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos. De castro y col., 2015 y Abdul-Wahab y col., 2012, identificaron vitexina en extractos totales de hojas de *P. aculeata* y *P. bleo*, acuñándolo como metabolito responsable del efecto antinociceptivo en modelos murinos. Sin embargo, en el extracto etanólico total de *P. sacharosa* no se presentó dicho metabolito, ya que en el perfil cromatográfico adicionado con vitexina, presentó un tiempo de retención de 11.19 minutos, exclusivo del estándar (Fig. 16A). Por otro lado, se ha propuesto que especies pertenecientes al género *Pereskia* poseen flavonoides glicosilados como parte de su composición (de Castro Campos Pinto y Scio, 2014). Richardson, 1978 reporta en las especies *P. bleo* y *P. grandifolia* la presencia de canferol, quercetina y C-glicoflavonoides, sin embargo, en el extracto etanólico total de *P. sacharosa* no se presentó dicho metabolito (Fig 16 A-B), ya que en el perfil cromatográfico adicionado con canferol-3-glucósido, presentó un tiempo de retención de 13.35 minutos

exclusivo del estándar. Tras el hidrolisis acida del extracto etanólico de *P. sacharosa*, fue posible llevar a cabo la escisión de la glucosa a través de la sustitución nucleofílica de anillo poli fenólico, obteniendo la aglicona canferol, la cual presentó un tiempo de retención similar al estándar 21.12 vs 21.32 minutos respectivamente, y máximos de absorbancia entre 265.6 y 366.7 nm (Fig. 16C y D). La identidad de este metabolito se propuso con base en la evidencia espectrométrica existente en la literatura, su tiempo de retención, la masa medida, el patrón de fragmentación obtenido en modo ion negativo y por comparación con el estándar auténtico de canferol. Para este compuesto, el ion pseudomolecular en m/z : 285,05 produjo fragmentos en m/z : 255, 153 y 151. El fragmento en m/z : 255 se generó debido a la pérdida de oxígeno y una molécula de agua. Se generaron fragmentos en m/z : 153 y 151 debido a la fragmentación del anillo C en la estructura poli fenólica básica (Fig. 16E), según lo informado por Li y col., 2016. Se observó el mismo patrón de fragmentación y el mismo tiempo de retención para el estándar de canferol auténtico (21.32 min) (Figura 16 C y D); ambos compuestos mostraron dos bandas de absorción a 265.6 y 366,7 nm, respectivamente. De igual manera las fracciones aisladas y evaluadas en la prueba de actividad antinociceptiva (C1F6 Y C1F9), mostraron bandas de absorción a una longitud de onda de 265 nm (Fig 17 A y B) sin embargo, sus tiempo de retención no coincidieron con los estándares, pero permitieron ampliar la visualización de los tiempos de retención del extracto etanólico total (Fig. 16A) mediante el fraccionamiento. Nuestra evidencia sugiere que la presencia de canferol como aglicona o como derivados son parte de los principales constituyentes de las hojas de *P. sacharosa*. Para este metabolito, se ha propuesto su funcionalidad como agente protector contra la hipertensión arterial pulmonar (Yi y col., 2022), así como actividad antimicrobiana (Özkütük, 2022), antiinflamatoria y antiobesidad (Bian y col., 2022). Por lo tanto, las especies pertenecientes a este género en su composición mayoritaria presentan flavonoides glicosilados, como se pudo observar en el extracto de *P. sacharosa* con relación a lo reportado con los extractos de *P. aculeata*, *P. bleo* y *P. grandifolia*. Martínez-González y col., 2017, identificaron canferol-3-glucosido en extracto etanólico total de hojas de *M. oleífera* siguiendo la misma metodología cromatográfica, metabolito

presente dentro de la composición mayoritaria del extracto etanólico, el cual presentó un tiempo de retención de (13.56 min) similar al del canferol-3-glucósido adicionado al extracto de *P. sacharosa* (13.35 min). Dicho extracto de *M. oleífera* en dosis de 100 y 300 mg/kg presentó efecto antinociceptivo en ratas en la fase inflamatoria, mismo efecto observado en ratones con extracto total de *P. sacharosa*, por lo cual se propone la presencia de canferol en forma glicosilada. Se han identificado otros flavonoides como la vitexina en hojas de *P. bleo* y otras especies de cactáceas como cultivos de callos de *Coryphantha macromeris* (Cabañas-García y col., 2021) y frutos de Opuntia (Fernández-López y col., 2010). Además, el canferol y sus glucósidos han sido reportados como productos naturales con propiedades antinociceptivas para el alivio del dolor funcional y no funcional (Martínez-González y col., 2017; Silva Dos Santos y col., 2020).

García y col., 2019, aislaron derivados de quercetina y glucósidos de canferol en *P. aculeata*. Pinto y col., 2015, y Abdul-Wahab y col., 2012, identificaron vitexina en extractos totales de hojas de *P. aculeata* y *P. bleo*. Richardson (1978) identificó en las especies *P. bleo* y *P. grandifolia* la presencia de canferol, quercetina y C-glicoflavonoides, vitexina y canferol-3glucósido, metabolitos que presentan características de flavonoles mono-hidroxilados 3-OH en el anillo B.

Los flavonoides que tienen muchos grupos hidroxilo o azúcares no sustituidos se consideran compuestos polares. La glucosa es el carbohidrato común presente en los flavonoides conjugados; sin embargo, se puede encontrar otro tipo de monosacáridos como galactosa, ramnosa, xilosa y el disacárido de rutina. Estos monosacáridos también se pueden unir al núcleo de benceno del flavonoide mediante enlaces carbono-carbono, con la diferencia de que el ataque se lleva a cabo solo en las posiciones 6 y 8 del núcleo de flavonoide (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Respecto al efecto biológico, estudios *in vitro* han demostrado que el canferol interfiere sustancialmente en varios mecanismos de inflamación, bloqueando la expresión tanto de la interleucina-1 beta como la del factor de necrosis tumoral. El canferol reduce los niveles de ARNm de citocinas promoviendo la activación de

ciertas enzimas y genes cruciales para la respuesta inflamatoria, inhibiendo su transcripción y sus efectos posteriores (Chen y Chen, 2012; Kowalski, y col., 2005).

El compendio metabólico secundario en *P. sacharosa* no se ha dilucidado completamente, debido a que se describen muy pocos metabolitos de esta especie. Sin embargo, en otras especies dentro de este mismo género se ha reportado la presencia de compuestos, que tienen actividad biológica, lo que sugiere que sus propiedades medicinales pueden ser el resultado de los flavonoides farmacológicamente bioactivos como es el canferol. Nuestros resultados sugieren que las propiedades medicinales de *P. sacharosa* pueden estar relacionadas con la presencia de derivados flavonoides bioactivos del canferol que será interesante caracterizar en detalle en futuros estudios.

8.7 Actividad Antinociceptiva

La prueba de dolor inducido por formalina es un ensayo biológico establecido que induce la nocicepción (dolor neurogénico o inflamatorio) por agentes químicos (Ferreira y col., 2006), observando las respuestas fisiológicas del animal con respecto al número de sacudidas y lamidas de la extremidad donde se indujo el daño (Fig. 18, 19 y 20). Abdul-Wahab y col., 2012, afirman que la fase neurogénica o temprana, presenta un lapso de corta duración, e inicia inmediatamente al daño mecánico inducido por la inyección y la entrada del agente químico, activando las fibras C del sistema nervioso periférico por estimulación. Mientras que la fase inflamatoria o fase tardía que es ocasionada por inflamación del tejido local tras un periodo prolongado de exposición al agente ocasiona cambios funcionales en las astas posteriores de la médula espinal encargada de las funciones sensitivas.

La administración del extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* colectadas en diferentes ambientes de aclimatación y a una dosis de 100 mg/kg presentó un efecto opuesto (antiinflamatorio) correspondiente a la fase II (inflamatoria) (Fig. 18 B y D), mientras que durante la fase I (neurogénica) no hubo cambios a nivel de la transferencia de señales en los nociceptores (Fig. 18 A y C). Abdul-Wahab y col., 2012, reportó una respuesta similar con extractos de *P. bleo* obtenidos a partir de

hexano, etanol, diclorometano y acetato de etilo, en una dosis de 30 y 100 mg/kg, en las que todos los extractos inhibieron el dolor a nivel inflamatorio (fase II). Sin embargo, estos autores sólo encontraron el efecto antinociceptivo correspondiente al número de sacudidas promedio; no observaron ningún efecto relacionado a la disminución de lamidas. Por el contrario, la administración del extracto etanólico de *P. sacharosa* presentó un efecto antiinflamatorio, tanto en el número de lamidas, como en el número de sacudidas en la fase II (Fig.18 B y D). La comparación de actividad antinociceptiva muestra el mismo efecto en la fase II de sacudidas entre *P. sacharosa* y *P. bleo*, sin embargo, las diferencias se hicieron presentes en relación con el número de lamidas. Castro y col., 2015 reportó disminución de lamidas y sacudidas en la especie *P. aculeata*, en la fase II de la prueba antinociceptiva, al suministrar extractos hidrometanólicos en una dosis de 300 mg/kg, ambas respuestas presentes en fase inflamatoria con el extracto de *P. sacharosa*.

La comparación inicial de extractos elaborados a partir de hojas colectadas en invernadero con respecto a hojas colectadas a la intemperie (100 mg/kg) demostró diferencia significativa de ambos tratamientos con respecto al control, sin embargo, un mayor efecto antinociceptivo se hizo presente con la disminución de más de un 90% de las respuestas conductuales, por el extracto de hojas colectadas a la intemperie. A partir del cual se realizó el análisis comparativo de dosis menores (10 y 30 mg/kg), a la par de las fracciones aisladas (C1F6, C1F9 y C4F13), estándares comerciales (luteolina, apigenina, vitexina, canferol y canferol-3-glucósido, en dosis de 5 mg/kg c/u) (Fig. 19) y coadministración con antagonistas que inhiben la respuesta nociceptiva inicial, del sistema nervioso periférico (naltrexona: antagonista opioide no selectivo, dosis 1 mg/kg, flumazenil; GABA_A/antagonista de receptores de benzodiazepinas, dosis 5 mg/kg y WAY100635: 5-HT_{1A}/antagonista de receptor de serotonina, dosis 0.32 mg/kg) (Fig. 20).

Los animales que recibieron formalina sin extracto tuvieron comportamientos de sacudidas y lamidas en la pata derecha donde se indujo el daño, mostrando un mayor efecto en la fase inflamatoria. Por el contrario, el extracto aplicado en los

bioensayos de actividad antinociceptiva mostró que las respuestas conductuales se relacionaron con una disminución de dolor periférico en los ratones tanto en la fase neurogénica como en la fase aguda o inflamatoria. La comparación inicial de las dosis de extractos de *P. sacharosa* mostró que a partir de 30 mg/kg hubo diferencia significativa con respecto al vehículo, sin embargo, se observó un mayor efecto antinociceptivo con la dosis de 100 mg/kg ($p < 0,001$), con una disminución de más del 80% en las respuestas conductuales para lamidas y sacudidas en fase inflamatoria mientras que, las dosis de 10 y 30 mg/kg mostraron una disminución del 50% ($p < 0.01$ o $p < 0.001$) (Fig 19 B y D). Guerra y col., 2018, evaluaron estas mismas respuestas en el extracto etanólico de *P. lychnidiflora* y afirmaron que la disminución en la fase inflamatoria es un indicador de un efecto analgésico contra el dolor de origen inflamatorio, respuesta asociada a la liberación de mediadores inflamatorios. Las fracciones aisladas C1F6, C1F9 y C4F13 presentaron un efecto antiinflamatorio en la segunda fase (inflamatoria), mostrando una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.01$ o $p < 0.001$). Notablemente, la fracción C4F13 ($p < 0.001$) inhibió completamente el número de lamidas y sacudidas en la fase inflamatoria (Fig. 19B y D). Este efecto sugiere que la acción antinociceptiva pudiera estar relacionada con mecanismos periféricos tardíos (fase II), debido a la posible inhibición y liberación de mediadores inflamatorios como bradiquinina, prostaglandina, histamina, bradiquininas, aminas simpaticomiméticas de serotonina, factor de necrosis tumoral e interleucinas entre otros, liberados de las patas de los ratones o por la inhibición directa de sus receptores. Estos mediadores también son el objetivo de la acción de la mayoría de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (Ortega y col., 2002; Abdul-Wahab y col., 2012). Por el contrario, no se observaron cambios en el nivel de transferencia de señal en los nociceptores durante la fase neurogénica (Fig. 19 A y C). Los extractos de *P. sacharosa* y las fracciones aisladas mostraron una respuesta antinociceptiva similar a especies del género *Pereskia*, como *P. Bleo* (Abdul-Wahab y col., 2012) y *P. aculeata* (Pinto y col., 2015) inhibiendo la respuesta conductual en la fase inflamatoria.

El análisis comparativo del extracto etanólico y de las fracciones aisladas mostró diferencias significativas en la fase inflamatoria en ambos comportamientos; estos cambios estarán relacionados con la bioactividad de los metabolitos secundarios presentes en *P. sacharosa*. Como se mencionó con anterioridad, a través del hidrólisis ácida y el análisis por HPLC-MS fue posible identificar canferol en la constitución fitoquímica. Este flavonol se ha identificado en otras especies del género *Pereskia* como *P. aculeata*, *P. bleo* y *P. grandifolia*. Varios estudios de canferol y compuestos conjugados tales como glucósidos aislados de diferentes especies de plantas, mostraron un efecto antinociceptivo. Wang y col., 2014, demostraron el efecto antinociceptivo en ratones, con canferol-3-glucósido aislado de flores de *Carthamus tinctorius*, mostrando un efecto bifásico significativo. Martínez-González y col., 2017, aislaron e identificaron el canferol-3-glucósido de las hojas de *Moringa oleifera* y evaluaron la actividad antinociceptiva en ratas. De Melo y col., (2009) aislaron glucósidos y ramnósidos de canferol de *Sedum dendroideum* y demostraron el efecto antinociceptivo de estos compuestos conjugados contra el dolor y los problemas inflamatorios. Abo-Salem (2014), demostró el efecto antinociceptivo del canferol en ratas, mostró un efecto significativo relacionado con la disminución del número de temblores y el tiempo dedicado a lamer en la fase inflamatoria. Se presentaron efectos similares en la fase inflamatoria en ratones CD1, usando estándares de canferol y canferol-3-glucósido; estos compuestos fueron bioactivos a dosis de 5 mg/kg, y también mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$ o $p < 0.001$) como fracciones aisladas con respecto al control (Fig. 20 B y D).

Otros metabolitos juegan un papel importante en la actividad antinociceptiva; De castro y col., 2015 afirman que el efecto antinociceptivo es generado en modelos biológicos al aplicar la fracción del extracto hidrometanólico de *P. aculeata* en la cual se encuentran inmersos metabolitos como vitexina y B-sitosterol. Abdul-Wahab y col., 2012 le atribuyen el efecto antinociceptivo a la vitexina presente en el extracto etanólico total de *P. bleo* en dosis de 30 y 100 mg/kg, las cuales presentaron efecto bifásico. Sin embargo, al administrar estas mismas dosis de extracto total de *P. sacharosa*, únicamente se presentó el efecto en la fase II, mientras que el estándar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vitexina no presentó dicho efecto por sí solo, por lo que el efecto generado por este metabolito puede que se presente en conjunto con el extracto total, ya que por sí solo, no presentó efecto significativo en las conductas de lamidas y sacudidas en la fase inflamatoria (Fig. 20 B y D). Por otro lado, la aglicona de la vitexina: apigenina, presentó efecto antinociceptivo en la fase II disminuyendo la respuesta en un 51.2%. Martins y col., 2012, aislaron apigenina de *Orbignya speciosa* y afirman que en una dosis de 3 mg/kg presenta un 50% de disminución de las respuestas conductuales en la fase II.

Hashemzai y col., 2017 demostró que la luteolina en dosis de 5 y 10 mg/kg presenta un efecto bifásico con respecto a la disminución de las lamidas, de igual manera afirman que este compuesto potencia fármacos del tipo opiáceo tras su administración en conjunto. En el diseño experimental con *P. sacharosa* la luteolina presentó un efecto bifásico en dosis de 5 mg/kg para las lamidas, mientras que para las sacudidas presentó el efecto en la fase II. Zhao y col., 2010, proponen que la luteolina y la apigenina pueden actuar como activadores potenciales de transportadores monoaminicos; en mayor efecto la luteolina que la apigenina, lo cual argumentan que podría deberse a un aumento de la translocación en la membrana de los transportadores o la alteración conformacional y la elevación de la expresión del transportador de monoamina a nivel genético, para la regulación positiva de la actividad de los transportadores de monoamina generada por luteolina. Siendo posible justificar estos efectos antinociceptivos por la similitud estructural de los flavonoides, opiáceos y monoaminas, debido a la presencia de anillos aromáticos pudiendo actuar como agonistas en los receptores transmembranales.

Los flavonoides por sí mismos, como metabolitos secundarios, están involucrados en funciones importantes en plantas como defensa, protección contra luz UV, señalización química y efecto sobre enzimas involucradas en la producción de pigmentos como la fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa, y en la inhibición de la enzima ácido indol-3-acético oxidasa generando un efecto antioxidante, pero en sistemas animales estas funciones pueden estar relacionadas con efectos

farmacológicos, permitiendo la bioactividad en el sistema circulatorio y mejorando la circulación periférica (primera manifestación en los procesos inflamatorios) y en consecuencia, la disminución del dolor, actuando mediante diferentes mecanismos de acción como la señalización neuronal, la relajación del músculo liso y/o la actividad antioxidante (Cartaya y Reynaldo, 2001; Korkina y Afanes'ev, 1996). En muchos casos, estas respuestas están relacionadas con un sinergismo de diferentes metabolitos secundarios. Malek y col., 2009, afirman que los metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, terpenos y esteroides, aislados del extracto de *P. bleo* permiten la sinergia en los modelos biológicos. Este sinergismo contribuye a la concentración, estructura e interacción entre los compuestos mayoritarios, de la misma manera que este efecto podría estar presente en el extracto etanólico de *P. sacharosa* y las fracciones aisladas que permiten el efecto antinociceptivo.

Con respecto al mecanismo de acción de *P. sacharosa*, se observó que los antagonistas por sí solos no mostraron un efecto antinociceptivo, como se esperaba, por otro lado, la coadministración con el extracto no impidió la respuesta antinociceptiva del extracto de la planta o de las fracciones en las fases neurogénica e inflamatoria. Por el contrario, se obtuvo una respuesta antinociceptiva mejorada en presencia de los antagonistas que con las fracciones aisladas (Fig. 20 B y D). Las respuestas conductuales disminuyeron, las lamidas se inhibieron por completo y las sacudidas se redujeron en un 90%. Los resultados de la coadministración mostraron una diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al control. Se observó la misma tendencia o comportamiento después de la evaluación de la fracción aislada C4F13, incluso mayor que la dosis más alta de extracto etanólico.

Los fármacos del tipo opioide presentan un mecanismo antinociceptivo que actúa de manera central y periférica (Gorzalczany y col., 2011; Henriques Monteiro y col., 2014). Se ha demostrado que los antagonistas de los receptores a opioides pueden intensificar la calidad aversiva de los estímulos nociceptivos, produciendo analgesia o alterando la dimensión del dolor, como la administración de naltrexona (Uhelski y Fuchs, 2009). Existen registros de que dosis ultra bajas de naltrexona o naloxona

potencian la analgesia generada por opioides, actuando en filamina A, proteína de andamiaje involucrada en la señalización del receptor de opioides μ (Toljan y Vrooman, 2018). Durante la prueba de formalina, este comportamiento estuvo presente en la coadministración mostrando analgesia y ptosis en los ratones. Estos efectos antinociceptivos deben estar relacionados con la similitud estructural que los flavonoides guardan con los opiáceos, debido a la presencia de anillos aromáticos que pueden actuar como agonistas en los receptores transmembranales.

Pinto y col., 2015, afirman que el mecanismo de acción de tipo opioide en *P. aculeata* se atribuye a la presencia de compuestos sinérgicos como la hordenina, la mezcalina y la vitexina. Estos metabolitos están involucrados en la actividad antinociceptiva, debido a su estructura química similar a los opioides. Se han descrito los mismos mecanismos en *P. bleo* y *P. sacharosa*, con actividad antinociceptiva relacionada a los mecanismos centrales del sistema opioide, un efecto adjudicado a la vitexina (Guilhon y col., 2015; Abdul-Wahab y col., 2012). Sin embargo, en *P. sacharosa* no existen antecedentes de presencia de vitexina y el análisis de HPLC-MS, lo confirma (Figura 16); la administración conjunta con naltrexona no mostró cambios en la actividad antinociceptiva, lo que demuestra que la acción opioide es un mecanismo independiente de la actividad de *P. sacharosa*.

En relación con las benzodiazepinas, se ha demostrado que los flavonoides presentan afinidad selectiva hacia los receptores BDZ, y también que pueden emplearse como herramientas para estudiar sitios moduladores en los receptores GABA tipo A (Medina y col., 1997; Wasowski y Marder, 2012). Existe una amplia gama de antecedentes sobre compuestos fenólicos aislados con afinidad por los receptores BDZ: la crisina aislada de *Passiflora coerulea*, fue el primer mono flavonoide natural descrito como ligando específico capaz de actuar como agonista parcial en los receptores centrales de BDZ; esta posee acciones ansiolíticas sin inducir sedación ni relajación muscular (Medina y col., 1997; Medina y col., 1990; Wolfmanet y col., 1994): El canferol aislado de *Tilia tomentosa* exhibe afinidad muy baja por el receptor BDZ no obstante, un complejo de naturaleza flavonoide aislado

de esta misma especie es capaz de producir efectos sedantes y ansiolíticos en ratones, relacionados con la actividad locomotora y ambulatoria total (Viola y col., 1994). La apigenina aislada de *Matricaria recutita* presenta una afinidad significativa por los efectos ansiolíticos y sedantes leves del receptor central de BDZ (Viola y col., 1995); cirsiolol, una flavona bioactiva de *Salvia guaranitica* presenta afinidad por el receptor BDZ por sus propiedades sedantes e hipnóticas (Marder y col., 1996). Aunque el extracto de *P. sacharosa* presenta fracciones aisladas enriquecidas con flavonoides, se observó que la administración conjunta con flumazenil no inhibió la actividad antinociceptiva, por lo que el mecanismo de acción GABAérgico es independiente del efecto generado por *P. sacharosa*.

Otros autores han establecido que la bioactividad de algunos flavonoides está asociada con el mecanismo de acción del receptor serotogénico 5-HT_{1A}. Martínez y col., 2009, evaluaron la actividad analgésica de *Tilia americana* y afirmaron que los glucósidos de quercetina presentes en esta especie son responsables de la actividad antinociceptiva, mediada por los receptores de serotonina 5-HT_{1A} en la respuesta inflamatoria. Karim y col., 2018, aislaron 3 flavonas aisladas de *Viola odorata* y evaluaron sus efectos en la administración conjunta con un antagonista en ratones, y propusieron que estos compuestos presentan efectos similares a los antidepressivos mediados por el sistema serotoninérgico. Wang y col., 2010, aislaron espinosina, de *Ziziphi spinosae* y propusieron que el efecto hipnótico potencial está relacionado con un mecanismo dependiente del receptor 5-HT_{1A} postsináptico. Otros estudios demostraron que los metabolitos secundarios como la quercetina, la isoquercetina y la rutina presentan actividades ansiolíticas y sedantes, que están mediadas por mecanismos serotoninérgicos y GABAérgicos (Aguirre-Hernández y col., 2016). Sin embargo, estos compuestos y actividades no estuvieron presentes en el extracto de *P. sacharosa*; la coadministración con WAY100635 no mostró cambios en la actividad antinociceptiva, lo que sugiere que los efectos antinociceptivos de *P. sacharosa* no están relacionados directamente con los mecanismos centrales que desencadenan la respuesta neurológica o fase I.

8.8 Inmunoensayos ELISA

El lipopolisacárido es un constituyente de la pared celular de organismos gram negativos que desencadena la respuesta inmune innata causada por la inflamación periférica, generando un conjunto coordinado de respuestas fisiológicas, endocrinas y conductuales reguladas por el SNC. En consecuencia, a su exposición, se producen una serie de mediadores inflamatorios incluidos la activación del complemento y el aumento de prostaglandinas y citocinas. Las citocinas y otras moléculas inflamatorias se sintetizan tanto en la periferia como en el SNC. En el SNC, las interleucinas IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), tienen efectos potentes sobre la excitabilidad neuronal y alteran las vías enzimáticas para la síntesis de neurotransmisores (Huangmig y col., 2012; Galic y col., 2012; O'Connor y col., 2009).

Tras la administración de LPS ocurre un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona, que alcanza un pico máximo de actividad entre 6 y 9 hrs de exposición y disminuye paulatinamente hasta regresar al nivel basal 24 hrs después (Sánchez y col., 2008). En el ensayo de LPS el análisis de comparación múltiple mostró el aumento esperado en la concentración de corticosterona a 3 horas de exposición en ambas cepas. Mientras que, en relación con el estado basal, la concentración de corticosterona disminuyó significativamente en ratones de la cepa CD1, pero en ratones de la cepa C57/BL6/JN, tras 9 horas de exposición en conjunto con el extracto de *P. sacharosa*, se observó una mayor sensibilidad. Haskó y col., 1995, evaluaron la concentración de corticosterona en la periferia de ratones empleando dosis de 2 mg/kg de LPS vía intraperitoneal, y encontraron un aumento significativo de los niveles corticosterona tras la exposición entre dos y tres horas seguido del inicio de la disminución de los niveles en sangre tras 8 horas de exposición. Nakano y col., 1987 evaluaron el efecto de LPS en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y afirmaron que es activado por enfermedades infecciosas, en específico por las endotoxinas presentes en bacterias gram negativas, las cuales aumentan la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y corticosterona, potenciando la producción de inmunoglobulinas. Su estudio demostró un aumento proporcional en suero sanguíneo de hormona ACTH, entre las dos y tres horas de

exposición, seguido de una disminución proporcional tras 8 horas de exposición, a la par con la producción de histamina y de la enzima que sintetiza histamina, la histidina descarboxilasa (HDC) tras 4 horas de exposición a LPS, y una disminución proporcional tras 8 horas de exposición en ratones de la cepa C57/BL6/JN.

Los glucocorticoides segregados durante la infección por bacterias gram negativas son esenciales para la supervivencia ya que previenen la sobre activación del sistema inmune, que ocurre principalmente como protección del animal en contra la infección bacteriana. En consecuencia, tras la administración de LPS se genera una elevación de los niveles de histamina en los tejidos, causando la secreción de corticosterona, la cual tiene la capacidad prevenir la producción de histamina causada por LPS a través de la inhibición de la enzima histidina descarboxilasa (Nakano y col., 1987). Se podría plantear que el efecto causado por el pretratamiento con *P. sacharosa* en la disminución de corticosterona tras 9 horas de exposición en cepa CD1, puede estar ligado al efecto regulatorio negativo de la histamina, disminuyendo la síntesis de la enzima histidina descarboxilasa y en consecuencia la neuro modulación, inhibiendo la excitabilidad celular a nivel periférico (Glass y col., 2010).

Por su naturaleza polar los compuestos fenólicos polares dentro de composición mayoritaria del pretratamiento de *P. sacharosa* podrían promover el efecto analgésico y antiinflamatorio, inhibiendo la producción de corticosterona, citocinas y mediadores proinflamatorias, respuesta que podría estar relacionado con los efectos observados en la fase inflamatoria en los ensayos de actividad antinociceptiva.

El SNC regula diversos aspectos de respuesta de reacción al estrés a través del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal así la ACTH o corticotropina, tiene un importante efecto anorexígeno, aumentando la ansiedad, la frecuencia cardiaca, la presión arterial y la modulación de la actividad del sistema inmune (Arce y col., 2006). Ikeda y col., 1999, afirma que el LPS activa el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal dando como resultado la producción de glucocorticoides endógenos, que son inhibidores naturales de la producción de citocinas; demostrando que altos niveles de corticosterona en ratones tras 30 minutos de exposición a LPS, no conllevan al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumento de citocinas proinflamatorias correspondientes a IL-1, IL-6 y TNF, manteniendo su nivel basal, debido a la liberación de la hormona adrenocorticotropa de la glándula pituitaria. Nicodemova y Watters, 2011, aislaron células microgliales de ratones CD1 y C57/BL6/JN, tras exposición a LPS y cuantificaron la expresión de genes para IL-6 en dichas células; identificaron que la cepa CD1 mostró mayor sensibilidad a LPS que C57/BL6/JN aumentando 3 veces la expresión de genes tras 3 horas de exposición, manteniéndose dicha expresión elevada, disminuyendo la expresión tras 18 horas de exposición mayormente en la cepa CD1 que en C57/BL6/JN. Este dato apoya la mayor sensibilidad de la cepa CD1 a LPS con respecto a la cepa C57/BL6/JN y cómo es que las células microgliales tras estímulos similares a infecciones bacterianas (LPS) son las responsables de potenciar la producción de citocinas proinflamatorias endocrinas. Beurel y Jope, 2009 evaluaron el aumento de la concentración de IL-6 en corteza cerebral, hipocampo, cerebelo y suero sanguíneo tras la exposición a LPS en una dosis de 10 mg/kg. Sus resultados mostraron que, transcurridas 3 horas de exposición a la endotoxina, se presentó un incremento considerable de IL-6 acompañado de un aumento en otras citocinas como TNF, IFN γ e IL-1 β en sangre, corroborando que la administración de LPS presenta efectos significativos en IL-6 tanto a nivel cerebral como en suero sanguíneo, mientras que los niveles de TNF α e IFN γ presentan un aumento moderado, con efectos leves en los niveles de IL-10. Minoge y col., 2012, describieron el mecanismo de liberación de IL-6 a nivel cerebral mediante la activación crónica de astrocitos; en un proceso que conlleva vías de señalización generadas por activación de proteínas quinasas, mitógenos (MAPK), factor nuclear kB (NF kB), complejo, quinasa Janus (JAK), transductores de señales, y activadores de la transcripción (STAT)-1; factores implicados en la secreción de citocinas proinflamatorias. El receptor tipo Toll (TLR4) es estimulado por LPS y desencadena la activación de MAPKS y NFkB que resulta en la liberación de TNF α and IL-1 β , el TNF α liberado interactúa con su receptor activando JAK2 y STAT1 potenciando la transcripción y liberación de IL-6, esta a su vez presenta un efecto autocrino retroalimentándose para inhibir la liberación de TNF α e IL-1 β , limitando los cambios inflamatorios (Fig. 25), dichos autores afirman que TNF α regula la producción de

IL-6 a través de la activación de vías de señalización JAK/STAT, y posteriormente la IL-6 puede impactar en la liberación de $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-10, sin embargo, por lo cual podemos concluir que en esta cascada de señalización inducida por LPS no se vio afectada ninguna tras la administración conjunta con *P. sacharosa*.

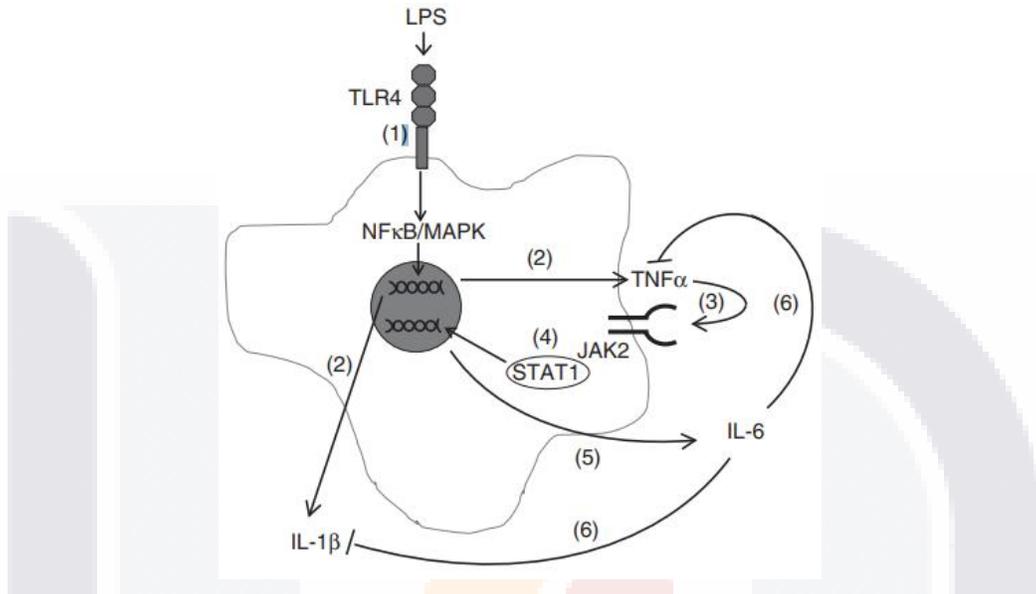


Fig. 25. Representación Propuesta por Minogue y col., 2012, Liberación de Citocinas por LPS de *E. coli*.

El análisis de varianza para la interleucina 6 mostró un aumento de la concentración en la periferia tras la exposición durante 3 horas con y sin extracto de *P. sacharosa*, dicho aumento se vio reflejado en más de $\approx 50\%$ en ambas cepas en comparación con los niveles basales de los vehículos, haciéndose presentes las diferencias significativas de los vehículos contra los organismos expuestos por tres horas en ambas cepas. Tras 9 horas de exposición se vio disminuida la concentración con y sin *P. sacharosa* en ambas cepas, mostrando que no hay cambios en la producción de IL-6, tal como se reporta en estudios previos ya mencionados con LPS, podemos proponer que la disminución en la producción de corticosterona puede ser inversamente proporcional al aumento de la IL-6 a nivel periférico y concluir que no hay cambios en IL-6 relacionados a *P. sacharosa*, ya que la sensibilidad y recuperación de los ratones CD1 en comparación con los ratones C57/BL6/JN, corresponde a efectos dependientes de la cepa, y no de la composición fitoquímica de extracto de *P. sacharosa*.

8.9 Análisis Microscópico de Epifluorescencia y Microscopía Confocal

En la figura 23 se muestra fluorescencia primaria, natural o intrínseca en los compuestos presentes en el extracto etanólico de *Pereskia sacharosa* tras haber sido expuestos a distintas longitudes de onda y observados con filtros específicos a diferentes aumentos. El filtro rojo lejano presenta una longitud de onda entre 710 y 850 nm, esta longitud de onda difiere con la fluorescencia emitida por compuestos fenólicos los cuales absorben luz en longitudes de onda que van desde los 250 nm hasta los 325 nm aproximadamente dentro del rango UV (Cartaya y Reynaldo 2001), donde se pueden agrupar diversos compuestos como son los ya mencionados compuestos fenólicos, flavonoides, criptocromos y clorofilas (Nagi y Schäfer, 2000). Sin embargo, en las figuras 23 A, B, C, D, G se observa fluorescencia con el filtro rojo lejano por lo cual se propone que no se encuentran únicamente este tipo de compuestos de naturaleza polar en el extracto, ya que este presentó zonas de emisión en dicho espectro en las cuales podrían estar presentes compuestos como son los fitocromos y pigmentos (Nagi y Schäfer, 2000).

Las figuras 23 E, H, F, I con filtro DAPI mostraron fluorescencia en tonalidades claras, esto debido a que el filtro DAPI es empleado para la detección de un marcador fluorescente de composición aromática con un máximo de absorción de longitud de onda de 358 nm UV que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, dichas tonalidades blanco-azuladas, presentes en el extracto y en los cortes de cerebro de roedor posiblemente sean compuestos con sistemas aromáticos conjugados, grupos 3-OH no sustituidos o grupos mono hidroxilados en el anillo B, correspondientes a compuestos fenólicos (Richardson, 1978).

Debido a la presencia de numerosos grupos OH instituidos o azúcares conjugados se les considera como compuestos polares (Cartaya y Reynaldo 2001), característica que podría conferirle al extracto de *P. sacharosa* su solubilidad en el fluido cerebro espinal y paso a través de la barrera hematoencefálica, esto debido a la presencia de proteínas transportadoras acopladas a membranas de células endoteliales, desarrolladas específicamente para diversos metabolitos, como es el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

caso del transportador de glucosa GLUT-1, cuya principal función es mantener el consumo basal de glucosa y el aporte de esta al cerebro, dicha proteína también transporta otras moléculas como galactosa y manosa (Sandoval-Muñiz, 2016). Azúcares que se encuentran conjugados a compuestos fenólicos, siendo la glucosa la más común presente en los flavonoides conjugados; sin embargo, se pueden encontrar otro tipo de monosacáridos como galactosa, ramnosa y xilosa (Cartaya y col., 2001).

A pesar de la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica a moléculas hidrosolubles esta barrera permite el transporte facilitado de glucosa, aminoácidos y algunos metabolitos intermedios (Von Bernhardt, 2004), se podría proponer que estos transportadores como el GLUT-1 son los responsables del paso de los compuestos fenólicos a través de la barrera hematoencefálica. Se ha informado que la fluorescencia de los flavonoides podría verse potenciada por la interacción de proteínas séricas como la albúmina, que forman complejos con los flavonoides, como se informó preliminarmente para la quercetina, la isorhamnetina y la quercetina-3'-sulfato; sin embargo, la estequiometría de los complejos flavonoides-albúmina puede diferir (Poór y col., 2018). Todas estas imágenes (Fig. 24) evidencian que los compuestos de *P. sacharosa* con propiedades fluorescentes son transportados al cerebro (tercer ventrículo, núcleo arcuato hipotalámico y áreas cerca como la arteria carótida interna, planteando la posibilidad de formar complejos de albúmina con canferol y derivados regulando su entrada a este tejido cerebral.

Se ha reportado la presencia de flavonoides antinociceptivos como hesperidina y diosmina en homogeneizados de tejido cerebral de rata mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas, 30 min después de su administración (Carballo-Villalobos y col., 2016), pero no el uso de análisis histológicos bajo el microscopio de epifluorescencia. En este estudio, las imágenes se obtuvieron tres horas después de la administración del vehículo, estándar, extracto y la fracciones purificada de flavonoides (Fig. 24) Las propiedades de fluorescencia de los flavonoides, como la quercetina, la miricetina e incluso el canferol, debido a la forma de resonancia de sus anillos, se han investigado y

optimizado mediante espectrofluorimetría (Monago-Maraña y col., 2016). El radical hidróxido puede ser útil para la unión del ligando en comparación con los flavonoides debido a la presencia del grupo metoxilo, como se exploró para la luteolina y la hesperetina mediante extinción de fluorescencia y espectroscopia de fluorescencia sincrónica (Tang y Jia, 2013), lo que corrobora que los flavonoides son de interés como potenciales agentes terapéuticos y se puede evidenciar mediante el uso de su auto fluorescencia con emisión en la longitud de onda verde, amarilla y naranja (Donaldson, 2020) como se evidenció en los resultados de este estudio mediante el uso de microscopía de epifluorescencia.

8.10 Hibridación *In situ*

Mediante la coadministración del extracto etanólico de *P. sacharosa* en conjunto con LPS, se esperaba que se revirtiera o disminuyera el efecto proinflamatorio de LPS, en el eje adrenal y en el eje tiroideo, no se pudo realizar ninguna correlación con estos, ya que en los cortes hibridados no se encontró ninguna material que fuera fluorescente, los cuales nos podrían mostrar la expresión del ARNm de D2, CRH y TRH, empleado microscopía de epifluorescencia y confocal (resultados no mostrados/no obtenidos), lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos con la prueba ELISA para la cuantificación de IL-6 en sangre. El extracto no disminuyó la producción de citocinas en sangre, siendo directamente proporcional a la que ocurre a nivel cerebral, ya que a nivel central la IL-6 es importante en la fisiología de la nocicepción y en la fisiopatología del dolor, debido a que es uno de los estimulantes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, siendo el principal mediador de la respuesta de fase aguda (Saavedra y col., 2010); dando como resultado la producción de glucocorticoides endógenos, que son inhibidores naturales de la producción de citocinas; demostrando que altos niveles de corticosterona en ratones tras 30 minutos de exposición a LPS, no conllevan al aumento de citocinas proinflamatorias, como ya se había mencionado anteriormente. Sin embargo, se pueden plantear perspectivas para futuros proyectos a partir de esta investigación, como es cuantificar el nivel de hormona tiroidea en sangre, el cual posiblemente se encuentre inhibido debido al aumento de corticosterona por efecto del LPS como se observó con los resultados obtenidos con la prueba ELISA para la cuantificación de

corticosterona en sangre, la inhibición del eje tiroideo siendo inversamente proporcional al aumento de corticosterona. La secreción de ACTH y su acción sobre la glándula adrenal, producirá un incremento de los niveles circulantes de glucocorticoides que a su vez inhibirán la producción de citocinas, estableciéndose un circuito de regulación entre los sistemas endocrino e inmune (Arce y col., 2006). Otra perspectiva que se puede plantear es sobre la expresión de c-Fos ya que su transcripción se vio en aumento en el SNC de los ratones de la cepa C57/BL6/JN (resultados no mostrados) tras la coadministración de *P. sacharosa* y LPS, lo cual requeriría un estudio amplio a futuro para ambas cepas.



9. Conclusiones

- El esquema implementado de micropropagación *in vitro* con BA y AIB permitió obtener tasas de multiplicación de 87.5%, enraizamiento de 42.8% y sobrevivencia del 100% por cada segmento nodal. Mientras que en la aclimatación a invernadero y adaptación por esquejes a la intemperie generaron un porcentaje de sobrevivencia del 100%.
- El uso de solventes orgánicos de gradiente apolar a polar permitió obtener el rendimiento mayor empleando metanol de 534.86 mg de extracto / g de hoja, mientras que el extracto etanólico permitió obtener un rendimiento del 188.45 mg de extracto / g de hoja seca, siendo este el idóneo para los ensayos biológicos y cuantificación de compuestos fenólicos por su composición enriquecida en estos metabolitos secundarios polares glicosilados, demostrada de manera cualitativa mediante cromatografía en capa fina, empleando como revelador NP/PEG..
- El extracto etanólico de *P. sacharosa* de hojas colectadas a la intemperie presentó una concentración de 23.75 ug equivalentes de ácido gálico y/o compuestos fenólicos por gramo de biomasa seca, y 3080.73 ug equivalentes de quercetina y/o flavonoides por gramo de biomasa seca, siendo los flavonoides los compuestos presentes en una concentración mayor de flavonoides a pesar de que este grupo de compuestos se encuentra dentro de los compuestos fenólicos. Sin embargo, debido a su alto contenido aminoacídico de esta especie es porque se da la variación espectrofotométría de la concentración de estos compuestos tras la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Los fraccionamientos múltiples del extracto etanólico en cromatografía en columna abierta en fase normal y fase reversa permitió aislar y purificar las fracciones C1F6, C1F8, C1F9, C2F8, C2F9, C2F15, C3F5 C4F13, C5F6, C5F7, C6F12. C7F6 y C7F7 enriquecidas con compuestos fenólicos, identificándose de manera cualitativa la presencia de canferol en hojas de *P. sacharosa*.

- La cromatografía líquida de alta resolución permitió identificar la presencia de canferol en el extracto etanólico total tras el hidrolisis ácida con HCL, presentando tiempo de retención similar de 21.12 min y 21.32 tanto el extracto como el estándar respectivamente, así como sus máximos de absorbancia entre 265.6 y 366.7 nm, proponiéndose la presencia de derivados de canferol conjugados a carbohidratos en *P. sacharosa*. A su vez las fracciones aisladas permitieron ampliar la visualización de los tiempos de retención del extracto etanólico total a una longitud de onda de 265.5 nm.
- La identidad del canferol mediante la espectrometría de masas se propuso con base en la evidencia espectrométrica existente en la literatura y a la fragmentación del ion pseudo molecular en m/z : 285.05 que produjo fragmentos en m/z : 255 debido a la pérdida de oxígeno y una molécula de agua, y se generaron fragmentos en m/z : 153 y 151 debido a la fragmentación del anillo C en la estructura poli fenólica básica.
- El extracto de hojas colectadas a la intemperie presentó un mayor efecto antinociceptivo que el de invernadero, disminuyendo ambas respuestas conductuales, y mejorando sus propiedades de tipo analgésico, esto podría deberse a la presencia de metabolitos secundarios correspondientes a compuestos fenólicos glicosilados.
- El extracto etanólico de hojas colectadas a la intemperie en dosis menores de 30 y 100 mg/kg mantuvo su efecto antinociceptivo en la fase inflamatoria al disminuir las conductas correspondientes a lamidas y sacudidas, mientras que en la fase neurogénica no hubo cambios.
- Las fracciones aisladas C1F6, C1F9, C4F13 y los estándares luteolina, apigenina, canferol y canferol-3-glucósido presentaron efecto significativo en la fase inflamatoria, sin embargo, la fracción C4F13 presentó una mayor diferencia significativa de las respuestas antinociceptivas, siendo estas casi nulas o en más de un 90% en dosis de 10 y 30 mg/kg.
- Los antagonistas no inhibieron los efectos antinociceptivos de *P. sacharosa*, lo que sugiere que el mecanismo de acción antinociceptivo de esta especie no está relacionado con los mecanismos centrales de opio receptores,

receptores GABAérgicos y receptores a serotoninérgicos. Por otro lado, podría estar relacionado con mecanismos periféricos tardíos, debido a la posible inhibición y/o liberación de mediadores inflamatorios como histamina entre otros, los cuales también son el mecanismo de acción de la mayoría de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos. Esto sugiere que los mecanismos periféricos deben explorarse mediante los efectos antinociceptivos de *P. sacharosa*.

- El inmunoensayo ELISA para corticosterona tras 3 y 9 horas de exposición a LPS mostró una mayor concentración de esta en sangre y diferencia significativa con los vehículos en ambas cepas, mientras que la administración en conjunto de *P. sacharosa* tras 9 horas de exposición a LPS disminuyó significativamente la concentración de corticosterona en ambas cepas CD1 y C57/BL6/JN, mostrando una mayor sensibilidad en ratones de la cepa C57/BL6/JN, respuesta que podría estar relacionado con la disminución proporcional de la histamina-corticosterona y regulación negativa de la enzima histidina descarboxilasa.
- El inmunoensayo ELISA para Interleucina-6 tras 3 horas y 9 horas de exposición a LPS mostró una mayor concentración de esta en sangre, presentando diferencia significativa con los vehículos en ambas cepas. Sin embargo, la producción de IL-6 presenta un efecto independiente a *P. sacharosa*, mostrando aumento en la respuesta inflamatoria: producción, sensibilidad y recuperación de los ratones CD1 en comparación con los ratones C57/BL6/JN, respuesta correspondiente a efectos específicos de la cepa.
- Empleando espectrometría de epifluorescencia fue posible la identificación de compuestos fenólicos del extracto etanólico de *P. sacharosa*, la fracción aislada C4F13 y el estándar canferol; los cuales se hacen presentes en zonas cercanas al tercer ventrículo como es la arteria carótida interna (icta), y como lograron atravesar la barrera hematoencefálica del cerebro de ratones haciéndose presentes en el tercer ventrículo, y en el núcleo arcuato

hipotalámico. Dicha fluorescencia puede ser potenciada por la interacción de los flavonoides con proteínas séricas como es la albumina.

- Se propone la hipótesis de que los compuestos fenólicos por su naturaleza conjugada a azúcares son capaces de ser solubles en el fluido cerebro espinal y atravesar la barrera hematoencefálica debido a la presencia de proteínas transportadoras GLUT-1 presentes en las células endoteliales.
- Mediante la hibridación *in situ* no se encontró un efecto central en el eje tiroideo y en eje adrenal.
- Hasta donde sabemos, este estudio es el primer informe de cultivo *in vitro*, análisis fitoquímico, actividad antinociceptiva y exploración del mecanismo de acción de *P. sacharosa*.
- Este trabajo contribuye al establecimiento de un cultivo *in vitro* y al conocimiento de la composición fitoquímica de esta planta, que implica la presencia flavonoides conjugados de canferol. Apoyado con el uso tradicional analgésico de *P. sacharosa* para tratar el dolor musculoesquelético.
- Los resultados dan evidencia de la actividad antinociceptiva principalmente en el caso de la afección inflamatoria, sin embargo, se podrían plantear diversas perspectivas; como explorar los mecanismos periféricos antinociceptivos de acción, para elucidar el efecto analgésico de la especie, mecanismos de transporte celular de flavonoides a nivel cerebral, la expresión de factores a nivel molecular como c-Fos y la cuantificación de la producción de hormonas tiroideas a nivel periférico en sangre tras la coadministración del extracto de *P. sacharosa* y LPS.

10. Bibliografía

- Abdul-Wahab, I.R., Guilhon, C.C., Fernandes, P.D., Boylan, F., 2012. Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.* 144,741-746.
- 741–746 Abo-Salem O. 2014. Kaempferol Attenuates the Development of Diabetic Neuropathic Pain in Mice: Possible Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(3): 424-430.
- Agostini-Costa T., Wondracek D., Rocha W., Silva D. 2012 Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Rev Bras Frutic*, 34(1):234–238.
- Akerele O. 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro mundial de la salud*, 14(4): 390-395.
- Alexiades, M., Sheldon, J. (1996) Protocol for Conducting Ethnobotanical Research in the Tropics. Selected Guidelines for Ethnobotanical Research: a Field Manual. *New York Botanical Garden*. EEUU. 306 p.
- Arce Vázquez V., Fernández Catalina P., Catalina P., Mallo Ferrer F. 2006. Endocrinología. Universidad de Vigo : Universidad de Santiago de Compostela. España. ISBN 84-9750-622-7411 p.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita., Montoya, C. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *DYNA*, 76(157): 109-121.
- Arranz-Álvarez A, J M. Tricás Moreno, O. Lucha López, A I. Jiménez Lasanta, P. Domínguez Oliván (1999). Neurofisiología del dolor: fundamentación teórica de los procesos fisioterápicos. Un reto para la Fisioterapia científica. *Fisioterapia* 21(2):73-87.
- Bermúdez, A., Oliveira-miranda, M. Velázquez, D. A. (2005). La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales : Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales. *Interciencia*, 30, 453–459.

- Beurel E., Jope R. 2009. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *Journal of Neuroinflammation* 6(9): 1-11.
- Bian, Y., Lei, J., Zhong, J., Wang, B., Wan, Y., Li, J., Liao, C., He, Y., Liu, Z., Ito, K., Zhang, B., 2022. aempferol reduces obesity, prevents intestinal inflammation, and modulates gut microbiota in high-fat diet mice. *J. Nutr. Biochem.* 99, 108840.
- Blatteis C. 2007. The onset of fever: new insights into its mechanism. *Prog Brain Res*, 162: 3-14.
- Borghi, S., Carvalho, T., Staurengo, L., Hohmann, M., Pingeo, P., Casagrande, R., Verri, W. 2013. Vitexin Inhibits Inflammatory Pain in Mice by Targeting TRPV1, Oxidative Stress, and Cytokines. *Journal of Natural Products*, 76: 1141-1149.
- Cabañas-García, E., Areche, C., Gómez-Aguirre, Y.A., Borquez, J., Muñoz, R., Cruz-Sosa, F., Balch, E.P.-M., 2021. Biomass production and secondary metabolite identification in callus cultures of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae), a traditional medicinal plant. *S. Afr. J. Bot.* 137, 1–9.
- Calva, G., Perez, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *DGSCA-UNAM*, 6(22): 2-16.
- Carballo-Villalobos, A.I., González-Trujano, M.-E., Pellicer, F., López-Muñoz, F.J., 2016. Antihyperalgesic effect of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *Biomed Res. Int.* 2016, 8263463.
- Carlos Moreno, Diana M. Prada. 2004. Fisiopatología del dolor clínico. *Asociación Colombiana de Neurología* 1: 37-51.
- Cartaya O., Reynaldo E. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2): 5-14.
- Casanova E. 2012. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presente en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Scientia* 4(2):161-175.

- Chen A., Chen Y. 2012. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem*, 138(4): 2099-2107.
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L., Poli, F., 2021. Plant secondary metabolites: an opportunity for circular economy. *Molecules* 26, 495.
- Coll M, Abdala L. 2005. Caracterización preliminar de los flavonoides mayoritarios de *Lippia turbinata* Griseb. en una muestra recogida en Vipos (Argentina). *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 546-9.
- Conde, B.E., Rogerio, I.T.S., de Siqueira, A.M., Ferreira, M.Q., Chedier, L.M., Pimenta, D. S., 2014. Ethnopharmacology in the vicinity of the botanical garden of the Federal University of Juiz de Fora, Brazil. *Ethnobot. Res. Appl.* 12, 21.
- Dantzer R., O'Connor J., Freund G., Johnson R., Kelley K. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9:46-56.
- De Aguiar, D., da Silva M., Ribeiro, S., Costa de Carvalho, C., Albarello, N. 2015. Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 122, 341-350.
- De Aguiar-Lage D., da Silva-Tirado M., Ribeiro-anicore s., Costa de Carvalho k., Albarello N. 2015. Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable., 122: 341-350.
- De Castro Campos Pinto N. 2015. *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. *Farm. Biol.* 53(12): 1780-178.
- De Castro Campos Pinto, N., Cunha Machado, D., Mello da Silva, J., Mota Conegundes, J. L., Moura Gualberto, A.C., Gameiro, J., Moreira Chedier, L., Marques Nogueira Castañon, M.C., Scio, E., 2015. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J. Ethnopharmacol.* 173, 330–337.

- De Castro Campos Pinto, N., Scio, E., 2014. The biological activities and chemical composition of pereskia species (Cactaceae)—a review. *Plant Food. Hum. Nutr.* 69, 189–195.
- De Melo, G.O., Malvar Ddo, C., Vanderlinde, F.A., Rocha, F.F., Pires, P.A., Costa, E.A., de Matos, L.G., Kaiser, C.R., Costa, S.S., 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *J. Ethnopharmacol.* 124, 228–232.
- Do Nascimento, J.E.T., de Moraes, S.M., de Lisboa, D.S., de Oliveira Sousa, M., Santos, S., Magalhaes, F.E.A., Campos, A.R., 2018. The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biomed. Pharmacother.* 107, 1030–1036.
- Donaldson, L., 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25 (10), 2393.
- Eblen-Zaijgur A. 2005. Neurofisiología de la nocicepción. *Gac Méd Caracas*, 113 (4): 466-473.
- Edwards, E., Nyffeler, R., Donoghue, M. 2005. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany*, 92(7): 1177-1188.
- Endotoxins and endocrine system. Bertók L.1998. *Domest Anim Endocrinol.* 5:305-8.
- Erschov E. 1991. Method for cultivation of cactuses grown on rootstock. Patent SU1665953. 1 6.
- Esteves B., Salazar I., Moreira A., Quintão M., Moreira L., Sales D. 2014. Ethnopharmacology in the Vicinity of the Botanical Garden of the Federal University of Juiz de Fora. *Ethnobotany journal*, 12(09): 91-106.
- Fernández-López, J.A., Almela, L., Obón, J.M., Castellar, R., 2010. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 253–259.

- Ferreira A., Amaral F., Duarte I., Oliveira P., Alves R., Silveira D., Azevedo A., Raslan D., Castro M. 2006. Anti-nociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 105:148-153
- Galic M., Riazi K., Pittman J. 2012. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol*, 33:116-125.
- Galván V., Gómez Y. 2016. Aclimatación de plantas in vitro DE *Pereskia sacharosa* y análisis del perfil químico (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- García, G. 2007. Plantas medicinales de Aguascalientes. Universidad Autonoma de Aguascalientes. México. 496 p.
- Garcia, J.A.A., Corrêa, R.C.G., Barros, L., Pereira, C., Abreu, R.M.V., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Bracht, A., Peralta, R.M., Ferreira, I., 2019. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic forest. *Food Chem* 294, 302–308.
- Ghezzi P., Sacco S., Agnello D., Marullo A., Caselli G., Bertini R. 2000. LPS induces IL-6 in the brain and in serum largely through tnf production. *CYTOKINE*, 12(8): 1205-1210.
- Gibson A., Nobel P. 1986. *Rhe Cactus Primer*. Harvard University Press. England. 263 p.
- Glass, C. K. and K. Saijo (2010). "Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells." *Nat Rev Immunol* 10(5): 365-376.
- González-Trujano, M.E., Gutiérrez-Valentino, C., Hernández-Arámburo, M.Y., Díaz- Reval, M.I., Pellicer, F., 2019. Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the antinociceptive activity of *Tagetes lucida* Cav. *Life Sci*. 231, 116523.
- Gorzalczany S., Marrassini C., Mino J., Acevedo C., Ferraro G. 2011. Anti-nociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urticacircularis*. *Journal of Ethnopharmacology* 134: 733-73

Guerra, R., Gómez, L.J., Castillo, U.G., Toloza, G., Sánchez-Pérez, J.P., Avalos, N., Mejía, J.G., Núñez, M.J., Moreno, M.A., 2018. Analgesic effect, phytochemical characterization and toxicological analysis of ethanolic extract of *Pereskia lychnidiflora* leaves. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* 35, 581–589.

Guilhon-Carvalho C., Abdul-Wahab I., Boylan F.,Dias-Fernandes P. 2015. Central Antinociceptive and Mechanism of Action of *Pereskia bleo* Kunth Leaves Crude Extract, Fractions, and Isolated Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1:915-927.

Guo X., Cui R., Zhao J., Peng., y Yan M. (2016). Corosolic acid protects hepatocytes against ethanol-induced damage by modulating mitogenactivated protein kinases and activating autophagy. *European Journal of Pharmacology*. 791;578-588.

Hajdu, Z., Hohmann, J., 2012. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragú'a Indian Reservation,Bolivia. *J. Ethnopharmacol.* 139, 838–857.

Hashemzaei N., Abdollahzadeh M., Iranshahi M., Golmakani E., Rezaee R., Tabrizian K. 2017. Effects of luteolin and luteolin-morphine co-administration on acute and chronic pain and sciatic nerve ligated-induced neuropathy in mice. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14 (1): 1-7.

Haskó G., Elenkov I., Kvetan V., Vizi E. 1995. Differential effect of selective block of α 2-adrenoreceptors on plasma levels of tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and corticosterone induced by bacterial lipopolysaccharide in mice. *Journal of Endocrinology*, 144 (3): 457-462.

Heinrich M., Frei Haller B., Marco L., M 2014. A Perspective on Natural Products Research and Ethnopharmacology in Mexico: The Eagle and the Serpent on the Prickly Pear Cactus. *ACSP publications*, 72(9): 678-681.

Hernández-Valle, E., Herrera-Ruiz, M., Salgado, G.R., Zamilpa, A., Arenas Ocampo, M.L., Jimenez Aparicio, A., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E., 2014. Anti-inflammatory

effect of 3-O-[(6'-O-Palmitoyl)- β -D-glucopyranosyl Sitosterol] from *Agave angustifolia* on Ear Edema in Mice. *Molecules* 19, 15624–15637.

Huangming H., Winnie H., Ken M., Quentin J., Keith A. 2012. Brain CB1 receptor expression following lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neuroscience*, 227:211-222.

Hunskar, S., Fasmer, O.B., Hole, K., 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods*. 14, 69–76.

Hunt D., Taylor N., Charles G. 2006. *The New Cactus Lexicon*. dh Books. United Kingdom. 527 p.

Ikeda M., Hamada K., Sumitomo N., Okamoto H., Sakakibara B. 1999. Serum Amyloid A, Cytokines, and Corticosterone Responses in Germfree and Conventional Mice after Lipopolysaccharide Injection. *Biosci, Biotechnol. Biochem*, 63 (6):1006-1010.

Johnson M. 2012. *Laboratory Mice and Rats*. Labome, 2:113.

Jusoh, M., Nagi. H., Yong, C., Mat, J., Seeni, A., Farid, M. 2014. Apoptosis Induction in MV4-11 and K562 Human Leukemic Cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) Leaf Crude Extract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1): 475-481.

Kany, S., Vollrath, J.T., Relja, B., 2019. Cytokines in inflammatory disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6008.

Kazama C. 2012. Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 144: 86-93.

King M. 1957. Studies on the tissue culture of cacti. *Cactus and Succulent Journal*, 29:101-104.

Klages F. 2006. *Tratado de Química Orgánica Tomo I*. Editorial Reverte. España. 1113 p.

- Kowalski J., Samojedny P, Pietsz G., Wilczok T. 2005. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α genes in J774.2 macrophages. *Pharmacological Reports*,57:390-394.
- Kritas S., Saggini A., Varvara G., Murmura G., Carafa A., Antinolfi P.2013. Luteolin inhibits mast cell- mediated allergic inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents*, 27 :955-959.
- Kumar S. & Pandey A. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 1-16. Pages. doi.org/10.1155/2013/162750.
- Lara, A., Valverde, R., Gómez, L., Hidalgo, N. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*, 27(2), 7-20.
- Lee S., Kim J., Kwon S., Lee Y., Choi S., Park J., Kwon H., 2009. Inhibitory effects of flavonoids on TNF α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB reports*, 42(5):265-270.
- Leucuta, S., Vlase, L., Gocan, S., Radu, L., Fodorea, C., 2006. Determination of Phenolic Compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat.* 28, 3109–3117.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. *Editorial INTA*. Argentina. 648 p.
- Li, Z.-H., Guo, H., Xu, W.-B., Ge, J., Li, X., Alimu, M., He, D.-J., 2016. Rapid identification of flavonoid constituents directly from PTP1B inhibitive extract of raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 54, 805–810.
- Loeser D., Treede R. 2008. The Kyoto protocol of AISP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137: 473-477.
- López-Muñoz F., Salazar L., Castañeda-Hernández G., Villareal J. 1993. A new model to assess analgesic activity: Pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res*, 28:169-172.

- Macías D., 2017. Establecimiento de cultivos de callos de *Pereskia* spp., su análisis fitoquímico y evaluación de actividad antioxidante. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 77p.
- Maganto V., Mingote., Lopéz M. 2015. Dolor. Asistencia Clínica. Mánejo en el Ambiti Medico-Psicológico. Diaz Santos. España. 276 p.
- Malek, S.N.A., Shin, S.K., Wahab, N.A., Yaacob, H., 2009. Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. *Molecules* 14, 1713–1724.
- Martinez R., Azpiroz H., Rodriguez, J. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas in vitro: *Eucalyptus urophylla* S.T blake y *Eucalyptus grandis hill ex maiden* Ra Ximhai. Universidad autónoma indígena de México 1(3):591-597.
- Martínez-González, C.L., Martínez, L., Martínez-Ortiz, E.J., González-Trujano, M.E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., Díaz-Reval, I., 2017. *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. *Biomed. Pharmacother.* 87, 482–488.
- Martínez-González., Martínez L., Martínez-Ortiz E., González-Trujano E. Déciga-Campos M., Ventura-Martínez R., Díaz-Revale I. 2017. *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 87: 482-488.
- Martins M., Boylan F., Días P. 2012. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. *Life Sciences*, 91: 293-300.
- Mauseth J. 1979. A new method for propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal*, 51:186-187
- Maze M., Tranquilli W. 1991. Alpha-2 adrenoreceptor agonist: Defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology*, 74:581-605.

- Minogue A., Barret J., Lynch A. 2012. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 β in a JAK2-dependent manner. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 β in a JAK2-dependent manner, 9: 116-126.
- Monago-Maraña, O., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T., Muñoz de la Peña, A., 2016. Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. Food Chem 196, 1058–1065. Phytomedicine Plus 2 (2022) 10033110.
- Murashige T, F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nabal M., y Madrid F. 2002. Dolor episódico: definición, etiología y epidemiología. R e v. Soc. Esp. Dolor 9: 88-93.
- Nagy F., Schäfer E. 2000. NUCLEAR AND CYTOSOLIC EVENTS OF LIGHT-INDUCED, PHYTOCHROME-REGULATED SIGNALING IN HIGHER PLANTS. EMBO Journal. 19:157-163.
- Nakano K., Suzuki S., Oh C. 1987. Significance of Increased Secretion of Glucocorticoids in Mice and Rats Injected with Bacterial Endotoxin. BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY, 1:159-172.
- Nikodemova M., Watters J. 2011. Outbred ICR/CD1 mice display more severe neuroinflammation mediated by microglial TLR4/CD14 activation than inbred C57Bl/6 mice, Neuroscience, 190:67-74.
- Núñez-Gastélum A. 2017. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza. Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 20 (2): 23-28,2017.
- Nurestri, S., Kae, S., Abdul, N., Yaacob, H. 2009. Cytotoxic Components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) Leaves. *Molecules*, 14: 1713-1724.

Obón C., Rivera D. 1991. Las plantas medicinales de nuestra región. *Regional de Murcia*. México. 153 p.

O'Connor J., Andre C., Wang Y., Lawson M., Szegedi S., Lestage J., Castanon N., Kelley K., Dantzer R., 2009. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci*, 29:4200–4209.

Ozkütük, A.S., 2022. Antimicrobial effects of carnosic acid, kaempferol and luteolin on biogenic amine production by spoilage and food-borne pathogenic bacteria. *Food Biosci* 46, 101588.

Park S. 2011. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br J Pharmacol*, 164(3): 1008-1025.

Patty Montgomery Orr, EdD, MSN, RN, Bettina Cobb Shank, MSN, BSN, RN*, Amy Conner Black, MSN, APRN, FNP-C (2017). The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Crit Care Nurs Clin N Am* 8:1-12.

Pawley J. 2006, *Biological Confocal Microscopy*. 3a ed. Springer, USA. 899 P.

Paxinos, G, Franklin, K.B.J., 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd. Academic Press.

Pérez Molphe, E., Ramirez, R., Gordon, H., Ochoa, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*. México. 179 p.

Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez-Reyes, M.E., Dávila-Figueroa, C.A., Villalobos-Amador, E., 2002. In vitro propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran desert. *HortScience* 37, 693–696.

Philip, K., Nurestri, S., Sani, W., Kae, S., Kumar, S., Sok, H., Guan, L., Rahman, S. 2009. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants from Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6(8), 1613-1617.

- Pitcher, G.M., Henry, J.L., 2002. Second phase of formalin-induced excitation of spinaldorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1509–1515.
- Poór, M., Boda, G., Kunsági-Máté, S., Needs, P.W., Kroon, P.A., Lemli, B., 2018. Fluorescence spectroscopic evaluation of the interactions of quercetin, isorhamnetin, and quercetin-3'-sulfate with different albumins. *J. Lumin.* 194, 156–163.
- Prado, D.E., 2000. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. *Edinb. J. Bot.* 57, 437–461.
- Quiroga R. 2013. Plantas medicinales del pueblo weenhayek. Museo de historia natural ALCIDE d'ORBIGNY. Bolivia. 62 p.
- Quiroga R., Arrázola S. 2013. Etnobotánica médica en cuatro etnias de las tierras bajas de Bolivia: un enfoque comparativo. *Revista de la sociedad boliviana de botánica*, 7 (1): 83-95.
- Quiroga, R., Arrázola, S., T´orrez, E., 2009. Medicinal flora diversity and useful local in the village of Weenhayek of Gran Chaco Province, Tarija, Bolivia. *Rev. Bol. Ecol. Y Cons. Amb.* 25, 25–39.
- Quiroga, R., Meneses, L., Bussmann, R.W., 2012. Medicinal ethnobotany in Huacareta (Chuquisaca, Bolivia). *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 8, 29. Richardson, M., 1978. Flavonols and C-Glycosylflavonoids of the caryophyllales. *Biochem. Syst. Ecol.* 6, 283–286.
- Rahmar, A., Parveen, F., Amira, N. (2013). Comparing the Effect of *Ficus Benjamina* Extract and *Pereskia Saecnarosa* Extract on the Level of Micro and Macro Minerals in Normal and Induced Liver Cancer Rats. *IFMBE Proceedings*, 40: 208-212.
- Ramakrishna A., Aswathanarayana G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11): 1720-1731.

Ramírez C., Teixeira J. 2008. Micropropagation of Cactus Plants (Cactaceae). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 5:219-226.

Raven P., Everet R., Eichhorn S. 1992. *Biología de las plantas*. Reverte. España. 482pp

Raven, H., Evert, R., Eichhorn, S. 1991. *Biología de las plantas Tomo I. Editorial Reverté*. EUA. 369 p.

Regal L., Alvarado M., Borges A., Miranda Alvarado J., Varens L., Cedeño J., Cuesta del Sol, J. 2015. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay*, 5(1): 47-62.

Riazi K., Galic., Kuzmiski J., Ho W., Sharkey K., Pittman Q. 2008. Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 17151–17156.

Richardson M. 1978. Flavonols and C-Glycosylflavonoids of the Caryophyllales. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6:283-286.

Rojas-Campos. 1995. El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas, recientes avances en estructura, genética y bioquímica. *Rev. costarric. cienc. méd*, 16(3):71-84

Saavedra P., Vasquez G., Gonzalez L. 2010. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *LATREIA*. 24(2):157-166.

Sachar R., Lyer R. 1959. Effect of auxin, kinetin and gibberellin on the placental tissue of *Pereskia aculeata* cultured in vitro. *Phytomorphology*, 9:1-3

Sanchez E., Singru P., Fekete C., Lechan R. (2008). Induction of Type 2 Iodothyronine Deiodinase in the Mediobasal Hypothalamus by Bacterial Lipopolysaccharide: Role of Corticosterone. *Endocrinology*, 149(5): 2484-2493.

Sandoval-Muñiz R., Vargas. Guerrero B., Flores-Alvarado L., Gurrola-Díaz. 2016. Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gaceta médica de México*. 152:547-557.

- Sarfaraaj M., Fareed S., Ansari S., Akhlaquer M., Zareen I., Saeed M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1): 10-20.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. 1989. Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain* 38:347–352.
- Silva Dos Santos, J., Gonçalves Cirino, J.P., de Oliveira Carvalho, P., Ortega, M.M., 2020. The pharmacological action of kaempferol in central nervous system diseases: a review. *Front Pharmacol* 11, 565700.
- Sim, K., Nirestri, A., Sinniah, S., Kim, K., Norhanom, A. (2010). Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. *Pharmacognosy Magazine*, 6(21): 67-70.
- Sim, K., Nurestri, A., Norhamon, A. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of crude and fractionated extracts of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(5): 193-201.
- Smith-Hall C., Overgaard L., H., Pouliot M. 2012. People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8(1): 1-11.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Tercera edición. Universitat Jaume. Nacional de las Misiones. España. 558 p.
- Tan, M.L., Sulaiman, S.F., Najimuddin, N., Samian, M.R., Tengku, Muhammad, T.S., 2005. Methnaolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 287–294.
- Tang, L., Jia, W., 2013. A comparison study on the binding of hesperetin and luteolin to bovine serum albumin by spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy* 103, 114–119.
- Uyub AM, Nwachukwu IN, Azlan AA, Fariza SS. 2010. In-vitro antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on

metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* and some pathogenic bacteria. *Ethnobot Res Appl* 8:95–106, ISSN:1547–3465

Vaera Y., Vaera Y., IVIRA Ñ. 2002. Plantas del chaco II Usos tradicionales Izoceño-Guaraní. Santa Cruz. Bolivia. 443 p.

Valdivielso A. 1998. Dolor agudo, analgesia y sedación en el niño (IIIa): Farmacocinética y farmacodinamia de los analgésicos opioides. *An Esp Pediatr*, 48: 429-440.

Valente L. 2007. PHCOG MAG.: Research Article Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. *Pharmacognosy Magazine*, 11(3): 167-172.

Von Bernhardt, R. 2004. La Barrera Hemato-Encefálica en la patología del Sistema Nervioso Central: su importancia en la Respuesta Inflamatoria. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 42(2), 121-130. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272004000200005>

Wagner H., Blatt S., Zgainski E. 1996. Plant drug analysis. New York: Springer-Verlag, 320p.

Wagner, H., Blatt, S., 1996. Plant Drug analysis: A thin Layer Chromatography Atlas, 2nd ed. Springer, Berlin, Germany.

Wahab, S., Abdul, A., Mohan, S., Al-Zubaira, A., Elhassan, M., Ibranhim, M. (2009). *International Journal of Pharmacology*, 5(1):71-75.

Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang, Y., Li, Y., Zhang, H., 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *J. Ethnopharmacol.* 151, 944–950.

White JG., Amos WB., Fordham M. 1978. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol.* 105(1):41-8. doi: 10.1083/jcb.105.1.41. PMID: 3112165; PMCID: PMC2114888.}

- Xu Y., Zhao Y., Guan Y., Zhang X., Chen Y., Wu Q., Zhu G., Chen Y., Sun F., Wang J., y Yu Y. 2017. Blocking inhibition to YAP by Actinomycin D enhances antitumor efficacy of Corosolic acid in treating liver cancer. *Cellular Signalling* 29: 209-217.
- Yi, J., Wang, X., Song, K., Ren, J., Che, H., Yu, H., Li, Q., 2022. Integrated metabolomics and mechanism to reveal the protective effect of kaempferol on pulmonary arterial hypertension. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 212, 114662.
- Zahid M., Kukreja A., Bisht N. 2012. Plant regeneration in *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand from embryogenic callus and cell suspension culture and assessment of genetic fidelity of plants derived through somatic embryogenesis. *Physiology Mol. Biol. Plants*,18(3): 253–263.
- Zhao G., Qin G., Wang J., Chu W., Guo L. 2010. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Neurochemistry International*, 56: 168-176
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.