



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Pereskia  
sacharosa* (Cactaceae) EN RATAS WISTAR Y DOS CEPAS  
MURINAS EXPUESTAS A LIPOPOLISACÁRIDO DE *E. coli*  
(O127:B8)**

PRESENTA

IBQ. María Fernanda Prado Fernández

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE  
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTORES

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Dra. Edith Sánchez Jaramillo

COMITÉ TUTORAL

Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch

Aguascalientes, Ags., Abril del 2023

## AUTORIZACIONES



CCBASICAS/ 049/2023

MARÍA FERNANDA PRADO FERNÁNDEZ  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA  
EN CIENCIAS AREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA  
P R E S E N T E.

Estimada Alumna María Fernanda Prado:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: "ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) EN RATAS WISTAR Y DOS CEPAS MIRINAS EXPUESTAS A LIPOPOLISACÁRIDO DE *E. Coli* (o127:B8)", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., 03 de abril del 2023



EL DECANO  
M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

**MTRO. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICA

PRESENTE

Por medio del presente como **COTUTORA** designada de la estudiante **MARÍA FERNANDA PRADO FERNÁNDEZ** con ID 157116 quien realizó la tesis titulada: **ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) EN RATAS WISTAR Y DOS CEPAS MURINAS EXPUESTAS A LIPOPOLISACÁRIDO DE *E. coli* (O127:B8)**, 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 ella 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 30 de marzo de 2023

*Yenny Adriana Gómez A.*  
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre  
Cotutora 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-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



**Dirección de Investigaciones en Neurociencias**

Ciudad de México a 30 de marzo de 2023

OFICIO No. DIN/00035/2023

Asunto: Carta de voto aprobatorio individual

**MTRO. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **COTUTORA** designada de la estudiante **MARÍA FERNANDA PRADO FERNÁNDEZ** con ID *157116* quien realizó *la tesis* titulada: **ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) EN RATAS WISTAR Y DOS CEPAS MURINAS EXPUESTAS A LIPOPOLISACÁRIDO DE *E. coli* (O127:B8)**, 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 ella 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

**Dra. Edith Sánchez Jaramillo**  
Cotutora de tesis  
Investigadora en Ciencias Médicas D

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

Calzada México Xochimilco N° 101, Col. San Lorenzo Huipulco, CP 14370, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México  
Tel: 55 4160 5050 [www.inprf.gob.mx](http://www.inprf.gob.mx)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química

MTRO. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICA

PRESENTE

Por medio del presente como miembro de Comité Tutorial designado de la estudiante **MARÍA FERNANDA PRADO FERNÁNDEZ** con ID 157116, quien realizó la tesis titulada: **ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) EN RATAS WISTAR Y DOS CEPAS MURINAS EXPUESTAS A LIPOPOLISACÁRIDO DE *E. coli* (O127:B8)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito. Con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, hago constar que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir mi **VOTO APROBATORIO**, para que ella 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 marzo de 2023

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch  
Miembro del Comité Tutorial

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-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19



**DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO**



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 04/04/2023

**NOMBRE:** María Fernanda Prado Fernández **ID** 157116

**PROGRAMA:** Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología **LGAC (del posgrado):** Biotecnología Vegetal

**TIPO DE TRABAJO:** ( X ) Tesis ( ) Trabajo Práctico

**TÍTULO:** Análisis de la actividad antiinflamatoria de *Pereskia scharasana* (Cactaceae) en ratas wistar y dos cepas murinas expuestas a lipopolisacárido de *E. coli* (0127:B8)

**IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):** Con este trabajo de tesis se buscó una nueva alternativa de tratamiento para afecciones inflamatorias, por lo que se ubica dentro del objetivo de salud de los Programas Nacionales Estratégicos de CONACYT.

INDICAR	SI	NO	N.A.	(NO APLICA)	SEGÚN	CORRESPONDA:
<b>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</b>						
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
SI						Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI						Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<b>El egresado cumple con lo siguiente:</b>						
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
SI						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
NA						Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<b>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</b>						
NA						Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
NA						El estudiante es el primer autor
NA						El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
NA						En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
NA						Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
NA						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   X    
No       

**FIRMAS**

**Elaboró:**

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

*Yenny Adriana Gómez A.*  
*Yenny Adriana Gómez Aguirre*

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

*Rosael Guerrero Alba*

\* 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:

*Juan José Rodríguez Borsari*

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

*Jorge María Álvarez 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.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.

Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.

Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DG-SEE-FO-15  
Actualización: 01  
Emisión: 28/04/20

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) por aceptarme en este posgrado, abrirme sus puertas y proporcionar sus laboratorios, principalmente la Unidad de Biotecnología Vegetal, así como su financiamiento en los proyectos PIBT19-2 Y PIBT22-5.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme recursos a través de la Beca Nacional (CVU: 1061400) durante el periodo que comprende la realización de la maestría; así como su financiamiento para el proyecto No. 1030 de Cátedras CONACyT.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la fuente Muñiz (INPRFM), por abrirme sus puertas durante mi estancia de investigación y proporcionarme de los recursos y el financiamiento necesarios para el proyecto NC19110.0 en el Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular.

A mis tutoras, la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre (UAA) y la Dra. Edith Sánchez Jaramillo (INPRFM) por guiarme a lo largo de este tiempo, por compartirme sus conocimientos, así como brindarme el apoyo y dedicación necesarios a través de cada etapa de este proceso. Al Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch (UAA), por formar parte de mi comité tutorial con su guía y consejos que permitieron la mejora de este proyecto.

Al Dr. Víctor Manuel Magdaleno Madrigal y el Ing. Miguel Pantaleón del INPRFM, por brindarme sus conocimientos y su ayuda en la realización de este proyecto, que no hubiera sido posible sin su guía.

A la LBT. Julia Victoria Nava Carmona y la Mtra. Adilene Dávila (UAA) por su paciencia, su motivación, su apoyo y su amistad a lo largo de la realización de este proyecto, así como a mis compañeros de laboratorio, por el entusiasmo y las alegrías que me han brindado.

A mis padres, Alberto y Gloria, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi educación, su amor y su ejemplo, me han hecho una persona dedicada y responsable al ser mi modelo a seguir. A mis hermanas, Viridiana y Anabelli, a mi cuñado y mis sobrinos, por su paciencia y sus ánimos a lo largo de esta etapa. Sé que siempre contaré con ustedes.

A mi pareja, Iván, por brindarme su apoyo en todo momento, por su paciencia y por motivarme durante todo este proceso, gracias por nunca dudar de mí. A mis amigos, especialmente Alejandra y Flor, quienes me ayudaron también con sus conocimientos, su amistad y su entusiasmo a lo largo de este tiempo, gracias por las risas y los momentos compartidos.

A mí, por llegar hasta aquí y por impulsarme a ser una mejor persona cada día.

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. El género <i>Pereskia</i> .....</b>	<b>15</b>
1.1.1. Descripción botánica de <i>P. sacharosa</i> .....	15
1.1.2. Usos y actividades biológicas del género <i>Pereskia</i> .....	16
1.1.3. Composición química del género <i>Pereskia</i> .....	18
<b>1.2. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Micropropagación .....	20
1.2.2. Cultivo de tejido calloso .....	20
1.2.3. Cultivos de tejido calloso en plantas del género <i>Pereskia</i> .....	21
<b>1.3. El lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas .....</b>	<b>21</b>
1.3.1. Estructura del LPS .....	22
1.3.2. Funciones del LPS en la bacteria .....	24
1.3.3. El LPS en <i>E. coli</i> .....	25
1.3.4. El LPS y la respuesta inflamatoria .....	25
<b>1.4. La neuroinflamación .....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Respuesta neuroinflamatoria .....	28
1.4.2. Papel del LPS en la neuroinflamación .....	29
<b>1.5. Estructuras importantes en el SNC .....</b>	<b>29</b>
1.5.1. Ventriculos cerebrales .....	29
1.5.2. Hipotálamo y núcleo arcuato .....	30
1.5.3. Hipocampo .....	30
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Objetivo General .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>33</b>

<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1. Propagación <i>in vitro</i> de <i>P. sacharosa</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2. Inducción y establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de tejido calloso.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de <i>P. sacharosa</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>5.4. Elaboración de extractos de hojas de la planta aclimatada y de tejido calloso.....</b>	<b>35</b>
<b>5.5. Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de <i>P. sacharosa</i> mediante cromatografía en columna abierta y análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) .....</b>	<b>36</b>
<b>5.6. Análisis de posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas, de callos y F10 de <i>P. sacharosa</i> mediante CCF .....</b>	<b>37</b>
<b>5.7. Análisis del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y fracciones de <i>P. sacharosa</i> en ratones adultos de las cepas CD1 y C57BL/6JN, sometidos a neuroinflamación con LPS .....</b>	<b>38</b>
5.7.1. <i>Animales</i> .....	38
5.7.2. <i>Fluorescencia de F10 al microscopio y su presencia en el cerebro de ratón</i> .....	38
5.7.3. <i>Actividad cerebral en ratas con LPS mediante electroencefalografía (EEG)</i> .....	39
5.7.4. <i>Análisis histológico del gen de respuesta temprana cFos y de CD14 mediante hibridación in situ en cortes de cerebro de ratones con LPS</i> .....	40
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>6.1. Propagación <i>in vitro</i> de <i>P. sacharosa</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>6.2. Inducción y establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de tejido calloso.....</b>	<b>42</b>
<b>6.3. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de <i>P. sacharosa</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>6.4. Elaboración de extractos de hojas de la planta aclimatada y de tejido calloso.....</b>	<b>45</b>
<b>6.5. Fraccionamiento del extracto etanólico de <i>P. sacharosa</i> mediante cromatografía en columna abierta y análisis mediante CCF .....</b>	<b>45</b>
<b>6.6. Análisis de posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas, de callos y F10 de <i>P. sacharosa</i> mediante CCF .....</b>	<b>49</b>
<b>6.7. Análisis del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y fracciones de <i>P. sacharosa</i> en ratones adultos de las cepas CD1 y C57BL/6JN, sometidos a neuroinflamación con LPS .....</b>	<b>51</b>
6.7.1. <i>Fluorescencia de F10 y su presencia en el cerebro de ratón</i> .....	51
6.7.2. <i>Actividad cerebral en ratas con LPS mediante EEG</i> .....	54

6.7.3. Análisis histológico del gen de respuesta temprano cFos y de CD14 mediante hibridación <i>in situ</i> , en cortes de cerebro de ratones con LPS .....	56
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
7.1 Propagación <i>in vitro</i> de <i>P. sacharosa</i> .....	59
7.2. Inducción y establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de tejido calloso.....	59
7.3. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de <i>P. sacharosa</i> .....	61
7.4. Elaboración de extractos de hojas de la planta aclimatada y de tejido calloso.....	62
7.5. Fraccionamiento del extracto etanólico de <i>P. sacharosa</i> mediante cromatografía en columna abierta y análisis por CCF .....	62
7.6. Análisis de posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas, de callos y F10 de <i>P. sacharosa</i> mediante CCF .....	63
7.7. Análisis del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y fracciones de <i>P. sacharosa</i> en ratones adultos de las cepas CD1 y C57BL/6JN, sometidos a neuroinflamación con LPS .....	63
7.7.1. Fluorescencia de F10 y su presencia en el cerebro de ratón.....	63
7.7.2. Actividad cerebral en ratas con LPS mediante EEG .....	65
7.7.3. Análisis histológico del gen de respuesta temprano cFos y de CD14 mediante hibridación <i>in situ</i> , en cortes de cerebro de ratones con LPS .....	67
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>71</b>

### ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para revelar grupos de compuestos. .... 37

**Tabla 2.** Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de hojas de *P. sacharosa* a la intemperie.  
..... 45

**Tabla 3.** Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de tejido calloso de *P. sacharosa*. ..... 45

**Tabla 4.** Fraccionamiento del extracto etanólico de *P. sacharosa*. ..... 46



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Características morfológicas de *P. sacharosa*. A) Fruto abierto y cerrado; B) hoja; C) tallo y espinas; D) espinas; E) botón floral. .... 16

**Figura 2.** Estructura general del LPS. Outer core, es el núcleo externo de la molécula, su estructura es variable y puede contener o no al antígeno O. Inner core, es el núcleo interno de la molécula y se encuentra más conservado que el núcleo externo ya que contiene moléculas de Kdo que se unen al lípido A. Tomado de: Sweeney & Lowary, 2019. .... 23

**Figura 3.** Respuesta inflamatoria al LPS dentro de la célula. El LPS está representado por las estructuras color gris unidas a TLR4/MD2 (color morado) en la membrana celular; esta acción desencadena una serie de eventos dependientes o independientes de MyD88 que resultarán en la transcripción y traducción de citocinas proinflamatorias, citocinas inducibles por IFN, así como factores de transcripción de éstas. Por otro lado, el LPS (gris) dentro de la célula desencadena la vía del inflamosoma a través de caspasas que terminan en piroptosis. TLR4= receptor tipo-“Toll” 4; MD2= factor de diferenciación mieloide tipo 2; MyD88-dependent= vía dependiente de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; MyD88-independent= vía independiente de MyD88; IFN= interferón. Tomado de: Simpson & Trent, 2019. .... 26

**Figura 4.** Planta de *P. sacharosa* propagada *in vitro*. .... 42

**Figura 5.** Etapas de la inducción de tejido calloso. Fotografías tomadas en microscopio (B-C; H-I) y su acercamiento en estereoscopio (D-F; J-L). A) y D) Explante inicial de tallo. B) y E) Tallo más tejido calloso a los 20 días de inducción. C) y F) Tejido calloso del tallo recolectado a los 40 días de inducción. G) y J) Explante inicial de hoja. H) y K) Hoja más tejido calloso a los 20 días de inducción. I) y L) Tejido calloso de la hoja recolectado a los 40 días de inducción. .... 43

**Figura 6.** Cinética de crecimiento del tejido calloso de *P. sacharosa*. .... 44

**Figura 7.** Crecimiento del tejido calloso con respecto al tiempo y su acercamiento en estereoscopio: A) y E) día 1; B) y F) día 10; C) y G) día 20; D) y H) día 30. .... 44

**Figura 8.** Separación por CCF de F1 a F3 en fase normal con cloroformo:metanol (100:0) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB. .... 47

**Figura 9.** Separación por CCF de F3 a F6 en fase normal con cloroformo:metanol (98:2) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB. .... 47

**Figura 10.** Separación por CCF de F6 a F14 más un control interno y un estándar de camferol (K), en fase normal con cloroformo:metanol (90:10) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB..... 48

**Figura 11.** Separación por CCF de F13 a F26, más estándares de camferol-3-O-β-rutinósido (K-R), ligustroflavona (LF) y vitexina (V), en fase reversa con agua:acetonitrilo (60:40) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB. .... 49

**Figura 12.** Separación por CCF del extracto etanólico de hojas (EH), extracto etanólico de callos (EC) y F10 de *P. sacharosa*, más un control interno y un estándar de camferol (K), en fase normal con cloroformo:metanol (90:10) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB. .... 50

**Figura 13.** Separación por CCF del extracto etanólico de hojas (EH) y del extracto etanólico de callos (EC) de *P. sacharosa*, más estándares de ligustroflavona (LF), camferol-3-O-β-rutinósido (K-R) y vitexina (V), en fase reversa con agua:acetonitrilo (60:40) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm..... 50

**Figura 14.** F10 observada al microscopio de fluorescencia con el filtro para DAPI. A) F10 recién preparada y conservada a 4 °C. B) F10 almacenada durante 1 semana a 4 °C. C) F10 mantenida durante 8 semanas a temperatura ambiente (T.A.). Las flechas en A, D, G), B, E, H) o C,F,I) muestran fragmentos de F10 observados con el microscopio de fluorescencia a una emisión de 460 nm a diferentes ampliaciones. .... 51

**Figura 15.** Presencia de F10 en cortes de cerebro del ratón. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI y observados al microscopio de fluorescencia con un filtro que emite a 460 nm (color azul). A esta longitud de onda F10 se observa en color fucsia (flechas). A, D) tercer ventrículo, B, E) ventrículo lateral ..... 52

**Figura 16.** Presencia de camferol en el tercer ventrículo cerebral de ratones. *Modificada de: Ruiz-Velasco-Martínez et al. (2022)* ..... 52

**Figura 17.** Presencia de ligustroflavona en el cerebro de ratón. A) Tercer ventrículo, B) ventrículo lateral, C) acueducto cerebral, D) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde las flechas rojas muestran la localización de los ventrículos cerebrales, E) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde las flechas rojas muestran la localización del acueducto cerebral. .... 53

**Figura 18.** Presencia de ligustroflavona en el cerebro de ratón. A) con filtro para DAPI en azul, B) con filtro verde, C) con filtro rojo, D) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde la flecha roja muestra la localización de los ventrículos cerebrales, E) corte rostro-caudal del cerebro de ratón,

donde las flechas rojas muestran la localización del tercer ventrículo dorsal. D3V: tercer ventrículo dorsal. PVA: núcleo paraventricular del tálamo, parte anterior. sm: estría medular, tálamo..... 53

**Figura 19.** Actividad eléctrica del hipocampo en ratas administradas con LPS. A) Gráfica de Transformada Rápida de Fourier de 0-50 Hz de frecuencia. B) Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-40 Hz). C) Gráficas de barras para cada tipo de onda evaluada a distintos tiempos..... 55

**Figura 20.** Actividad eléctrica del hipocampo en ratas administradas con F10 + LPS. A) Gráfica de Transformada Rápida de Fourier de 0-50 Hz de frecuencia. B) Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-40 Hz). C) Gráficas de barras para cada tipo de onda evaluada a distintos tiempos..... 55

**Figura 21.** Distribución del ARNm para cFos y CD14 en la región CA3 del hipocampo. El filtro rojo indica la presencia de CD14, el filtro verde la presencia de cFos y el filtro azul indica la ubicación de los núcleos de las células neuronales teñidos con DAPI. En la primera columna se muestra en color rojo brillante la expresión de CD14. En la segunda columna se observa el contraste entre cFos (rosa) y CD14 (rojo brillante). En la tercera columna se observa la superposición de cFos (verde) y CD14 (rojo) con los núcleos celulares (azul)..... 56

**Figura 22.** Distribución del ARNm para cFos y CD14 en el núcleo arcuato del hipocampo. El filtro rojo indica la presencia de CD14, el filtro verde la presencia de cFos y el filtro azul indica la ubicación de los núcleos de las células neuronales teñidos con DAPI. En la primera columna se muestra en color rojo brillante la expresión de CD14. En la segunda columna se observa en color verde la expresión de cFos. En la tercera columna se observa la superposición de cFos (verde) y CD14 (rojo) con los núcleos celulares (azul). ..... 57

**Figura 23.** Porcentaje de células positivas a cFos o CD14 en el núcleo arcuato del hipotálamo La línea punteada indica que las células positivas a cFos y CD14 es menor que el 100% de las células contabilizadas mediante su tinción con DAPI. .... 58

**Figura 24.** Efecto de F10 de *P. sacharosa* sobre la expresión de cFos y CD14 en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones expuestos al LPS. La letra “a” indica los grupos con diferencias significativas con respecto al vehículo; la letra “b” los grupos con diferencias significativas con respecto a grupo de LPS 3h; la letra c los grupos con diferencias significativas con respecto al F10 + LPS 3h..... 58

## ACRÓNIMOS

**°C:** Grados Celsius

**2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**2iP:** Isopentiladenina

**5-HT1A:** 5-hidroxitriptamina 1A

**AIA:** Ácido indolacético

**ANA:** Ácido naftalenacético

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**AS:** Anisaldehído-ácido sulfúrico

**BA:** Benciladenina

**BAP:** 6-bencilaminopurina

**CCF:** Cromatografía en capa fina

**CD14:** Cluster differentiation 14

**CIN:** Cinetina

**cm:** Centímetros

**CONACyT:** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

**COX-1:** Ciclooxigenasa 1

**COX-2:** Ciclooxigenasa 2

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

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

**DTT:** Ditiotreitól

**EC:** Extracto etanólico de callos de *P. sacharosa*

**EH:** Extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa*

**FRAP:** Ferric reductor/antioxidant power (poder reductor/antioxidante férrico)

**g L<sup>-1</sup>:** Gramos sobre litro

**g:** Gramos

**GABAA:** Gamma-aminobutyric acid (ácido gamma-aminobutírico)

**h:** Hora

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Ácido sulfúrico

**HCl**: Ácido clorhídrico

**Hz**: Hertz

**IC**: Índice de crecimiento

**IL**: Interleucina

**INF**: Interferón

**iNF-kB**: Inhibidor de NF-kB

**iNOS**: Inducible nitric oxide synthase (óxido nítrico sintasa inducible)

**INPRFM**: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

**ip**: Vía intraperitoneal

**K**: Camferol

**Kdo**: Ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico

**K-R**: Camferol-3-O-β-rutinósido

**LB**: Reactivo de Lieberman-Burchard

**LBP**: Lipid binding protein (proteína de unión a lípidos)

**LF**: Ligustroflavona

**LOS**: Lipooligosacárido

**LPS**: Lipopolisacárido

**Luz UV**: Luz ultravioleta

**MAPK**: Mitogen-activated protein kinase (proteína quinasa activada por mitógenos)

**MD2**: Myeloid differentiation factor 2 (factor de diferenciación mieloide 2)

**mesh**: Número de hilos por pulgada en una malla

**mg/kg**: Miligramo sobre kilogramo

**mg L<sup>-1</sup>**: Miligramos sobre litro

**min**: Minutos

**mL**: Mililitro

**mm**: Milímetro

**MS**: Medio de cultivo Murashige & Skoog

**MyD88**: Myeloid differentiation factor 88 (factor de diferenciación mieloide 88)

**N**: Normal (concentración)

- NaCl:** Cloruro de sodio
- NaOH:** Hidróxido de sodio
- NF- $\kappa$ B:** Nuclear factor kappa B (factor nuclear kappa B)
- NIH:** National Institutes of Health
- nm:** Nanómetros
- NOS:** Nitric oxide synthase (óxido nítrico sintasa)
- NP/PEG:** 2-aminoetildifenilborinato/polietilenglicol
- ONU:** Organización de las Naciones Unidas
- PBS:** Phosphate buffered saline (solución salina tamponada con fosfatos)
- pH:** Potencial de hidrogeno
- Picloram:** Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico
- PRONACES:** Programas Nacionales Estratégicos del CONACyT
- PSI:** Pounds-force per square inch (libras sobre pulgada cuadrada)
- RCV:** Regulador de Crecimiento Vegetal
- Rf:** Retention factor (factor de retención)
- ROS:** Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas del Oxígeno)
- SDS:** Sodium docecyl sulfate (dodecil sulfato sódico)
- SNC:** Sistema Nervioso Central
- SSC:** Citrato de sodio
- SSI:** Solución salina isotónica
- TA:** Temperatura ambiente
- t<sub>d</sub>:** Tiempo de duplicación
- TDZ:** Tidiiazurón
- TIR:** Toll/IL-1 receptor
- TIRAP:** TIR Domain Containing Adaptor Protein (proteína adaptadora que contiene el dominio TIR)
- TLR4:** Toll-like receptor 4 (receptor tipo Toll 4)
- TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
- TNT:** Tris-HCL, NaCl, Tween 20
- TRAM:** TRIF-related adaptor molecule (molécula adaptadora relacionada con TRIF)

**TRIF:** TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (adaptador inductor de interferón- $\beta$  que contiene el dominio TIR)

**Tris-HCl:** Trisaminometano-ácido clorhídrico

**UAA:** Universidad Autónoma de Aguascalientes

**V:** Vitexina

**WFO:** World Flora Online

**$X_0$ :** Peso seco de la biomasa inicial

**$X_f$ :** Peso seco de la biomasa final

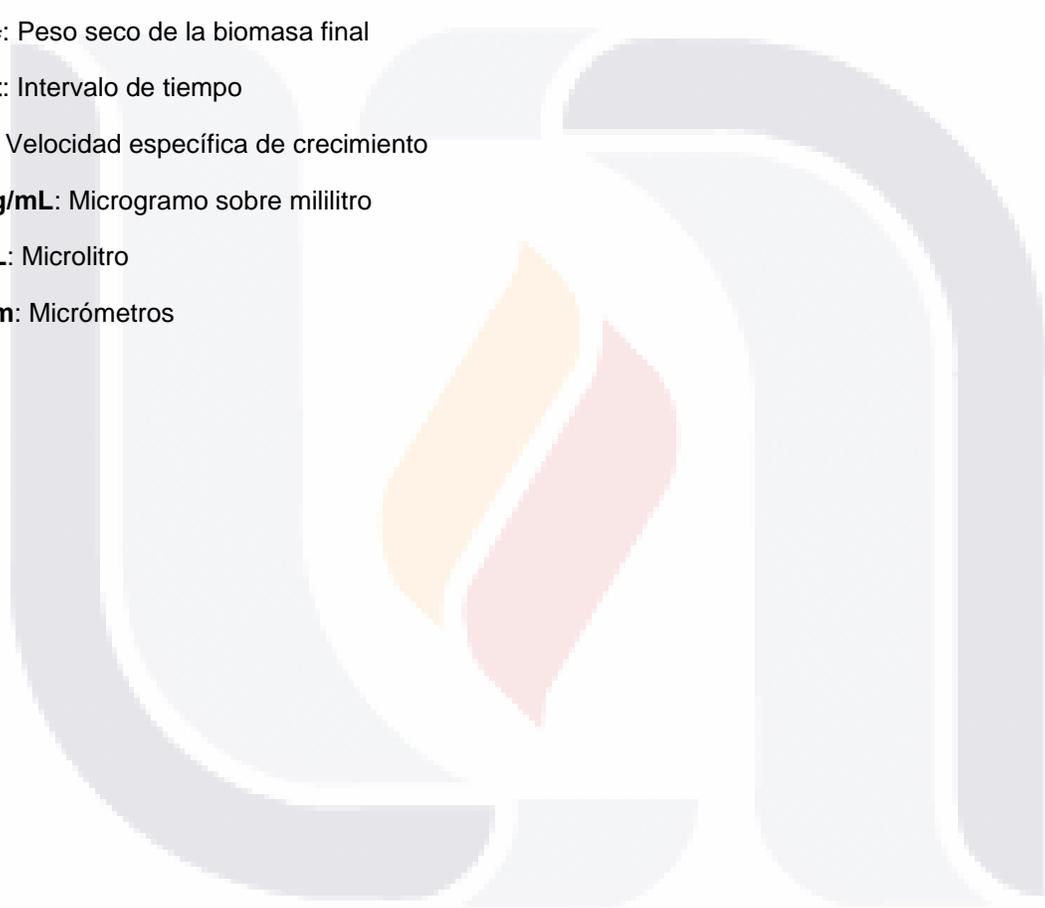
**$\Delta t$ :** Intervalo de tiempo

**$\mu$ :** Velocidad específica de crecimiento

**$\mu\text{g/mL}$ :** Microgramo sobre mililitro

**$\mu\text{L}$ :** Microlitro

**$\mu\text{m}$ :** Micrómetros



## RESUMEN

*Pereskia sacharosa* Griseb. es una planta que se emplea en la medicina tradicional como analgésico y para trastornos de la piel. Actualmente, se buscan tratamientos ante enfermedades neurodegenerativas, donde está involucrada una respuesta inflamatoria crónica. En este trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria de *P. sacharosa* en modelos animales sometidos a neuroinflamación con lipopolisacárido y se identificaron compuestos en la planta y cultivos *in vitro* de tejido calloso, como alternativa al uso de ejemplares del ambiente. A partir de plantas cultivadas *in vitro*, se indujo tejido calloso con ácido naftalenacético y tidiazurón. Se obtuvo el extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* y se separaron los compuestos mediante cromatografía en columna abierta, y sus fracciones, así como el extracto etanólico de callo, se analizaron mediante cromatografía en capa fina para identificar grupos de compuestos. Por otro lado, ratones CD1 y C57BL/6JN se administraron con la fracción 10 y su presencia en cortes cerebrales se analizó por microscopía de fluorescencia; mientras que cortes de ratones con LPS o F10+LPS, se sometieron a hibridación *in situ* para detectar ARNm de cFos, marcador de actividad neural, y CD14, receptor del LPS. Finalmente, ratas Wistar con LPS o F10+LPS se sometieron a electroencefalografía del hipocampo. Como resultados, se estableció un cultivo de callos y el análisis cromatográfico reveló flavonoides, terpenos y esteroides. En ratones, F10 atravesó la barrera hematoencefálica y redujo la expresión de cFos y CD14 en el hipotálamo a las 3 h. Además, la actividad eléctrica del hipocampo en ratas con LPS mostró disminución de ondas theta, mientras que con F10 se mantuvo esta actividad, relacionada con movimiento y relajación. Estos hallazgos indican que los compuestos de *P. sacharosa* disminuyen los signos de inflamación, permitiendo el regreso temprano de la actividad ambulatoria del animal aún con la enfermedad activa.

**Palabras clave:** neuroinflamación, tejido calloso, fitoquímica, electroencefalografía, cFos, CD14.

## ABSTRACT

*Pereskia sacharosa* Griseb. is a plant used in traditional medicine as an analgesic and for skin disorders. Currently, treatments are requested for neurodegenerative diseases where a chronic inflammatory response is involved. In this work, antiinflammatory activity of *P. sacharosa* was evaluated in animal models exposed to neuroinflammation with lipopolysaccharide, and compounds were identified in the plant and callus tissue cultures as an alternative of the use of environmental specimens. Callous tissue was induced from in vitro cultured plants with naphthaleneacetic acid and thidiazuron. Ethanolic extract of *P. sacharosa* leaves was obtained, and compounds were separated by open column chromatography and its fractions, as well as callus extracts, were analyzed by Thin Layer Chromatography to identify compounds groups. On the other hand, CD1 and C57BL/6JN mice were administered with fraction 10, and its presence in brain slices was analyzed by fluorescence microscopy; while sections of mice with LPS or F10+LPS, were subjected to *in situ* hybridization to detect cFos mRNA, marker of neural activity, and CD14, LPS receptor. Finally, Wistar rats with LPS or F10+LPS underwent electroencephalography of the hippocampus activity. As result, a callus culture was established, and chromatographic analysis revealed flavonoids, terpenes, and sterols. In mice, F10 crossed the blood-brain barrier and reduced cFos and CD14 expression in hypothalamus at 3 h. In addition, the electrical activity of hippocampus in rats with LPS showed decreased in theta waves, although with F10 this activity, related to movement and relaxation, was maintained. These findings suggest that *P. sacharosa* compounds decrease signs of inflammation, allowing the early return of ambulatory activity of animal even with active disease.

**Keywords:** neuroinflammation, callous tissue, phytochemistry, electroencephalography, cFos, CD14.

## INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales se informa desde la antigüedad e incluso puede considerarse el origen de la medicina moderna; por lo que los compuestos de origen vegetal han sido y siguen siendo una fuente importante de materia prima para fármacos (Bermúdez et al., 2005).

Actualmente, se buscan nuevos tratamientos ante una gran variedad de padecimientos como las enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, los trastornos del sueño y los accidentes cerebrovasculares; en donde está altamente involucrada una respuesta neuroinflamatoria crónica. Para ello, las investigaciones en plantas medicinales representan una nueva alternativa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que afectan al Sistema Nervioso Central (SNC) (Welcome, 2020).

Las actividades biológicas de las plantas medicinales se asocian a su perfil fitoquímico, ya que poseen diversos tipos de metabolitos como los compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, terpenos, y esteroides. Estos compuestos proporcionan beneficios a la salud, lo que justifica su uso y su aislamiento para la fabricación de fármacos con importantes aplicaciones en la medicina moderna (Dillard & German, 2000). Además, una forma de obtener metabolitos secundarios de una planta es mediante el cultivo de tejido calloso *in vitro* (Bhatia, 2015; Loyola Vargas & Ochoa Alejo, 2018). Este último consiste en una masa de tejido con células indiferenciadas cultivadas en condiciones asépticas y entornos controlados, el cual proporciona una nueva tecnología para la producción de biomasa y compuestos bioactivos similares a los presentes en la planta (Li et al., 2022).

Las especies del género *Pereskia* se utilizan en la medicina tradicional por sus actividades analgésica, citotóxica, antimicrobiana, así como antisifilíticos, expectorantes y emolientes (de Castro Campos Pinto & Scio, 2014). *Pereskia sacharosa* Griseb. es una planta que se ubica principalmente en Sudamérica (Anderson, 2001) y sus hojas y frutos se emplean en la medicina tradicional para tratar trastornos de la piel y el dolor de oído, mientras que las espinas se utilizan contra el dolor muscular (Hajdu & Hohmann, 2012). El perfil fitoquímico de *P. sacharosa* ha arrojado la presencia de flavonoides y ya se ha evaluado su actividad antinociceptiva (Ruiz Velasco Martínez et al., 2022).

Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria de *P. sacharosa* en ratas y ratones sometidos a neuroinflamación con lipopolisacárido (LPS), una endotoxina presente en las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*. Además, se exploró el perfil fitoquímico de la planta y de cultivos de tejido calloso para conocer metabolitos en común que pudieran tener dicha actividad biológica y que puedan utilizarse como opción para enfermedades antiinflamatorias especialmente aquellas que afectan el SNC.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. El género *Pereskia*

De la familia *Cactaceae* y subfamilia *Pereskioideae*, las plantas del género *Pereskia* se encuentran principalmente en los trópicos del continente americano, desde el sur de México y el Caribe hasta el norte de Argentina y Uruguay, predominantemente en regiones áridas (Anderson, 2001). *Pereskia* está aceptado como el género que más se parece a lo que pudo haber sido el primer cactus, por lo que es conocida como el “cactus ancestral” (Butterworth & Wallace, 2005). Además, fueron los primeros cactus estudiados y fue Charles Plumier (religioso y botánico francés [1646 - 1704]), quién en 1703 asignó el nombre de *Pereskia* en honor a Nicolas-Claude Fabri de Peiresc (astrónomo, abogado y botánico francés [1580-1637]) (Leuenberger, 1986).

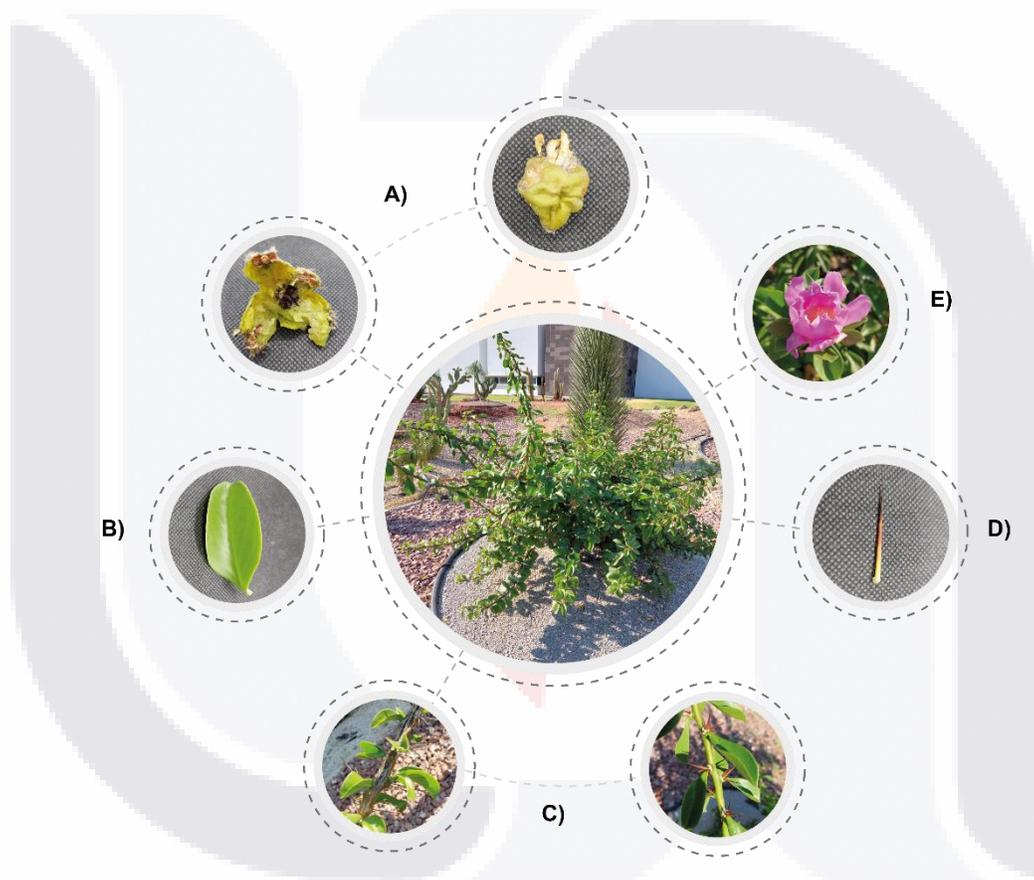
Dentro del género *Pereskia*, se han clasificado 17 especies, de las cuáles, las más comunes son *Pereskia aculeata* Mill. (grosellero de Barbados, bugambilia blanca, ramo de novia), *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (nají o chupa melón), *Pereskia lychnidiflora* DC. (árbol del matrimonio), *Pereskia grandifolia* Haw. (guamacho morado o cactus rosa) y *Pereskia guamacho* F.A.C.Weber (guamacho). Las otras especies corresponden a *Pereskia aureiflora* F. Ritter, *Pereskia bahiensis* Gürke, *Pereskia diazromeroana* Cárdenas, *Pereskia horrida* DC., *Pereskia marcanoi* Areces, *Pereskia quisqueyana* A.H. Liogier, *Pereskia nemorosa* Rojas Acosta, *Pereskia portulacifolia* (L.) DC., *Pereskia weberiana* K. Schum., *Pereskia stenantha* F. Ritter, *Pereskia zinniiflora* DC. y *Pereskia sacharosa* Griseb. (WFO, 2022). En Sudamérica, principalmente en Brasil, se les conoce a las plantas del género *Pereskia* como *ora-pro-nobis*, especialmente a *P. aculeata* y *P. grandifolia* (Anderson, 2001).

En particular, *P. sacharosa* se distribuye en las tierras bajas de los Andes y en la región del Gran Chaco de Brasil, Bolivia, Paraguay, así como en el noroeste de Argentina (Anderson, 2001). También es conocida por las sinonimias: *Rhodocactus sacharosa* (Griseb.) Backeb., *Rhodocactus saipinensis* (Cárdenas) Backeb., *Pereskia moorei* Britton & Rose, *Pereskia saipinensis* Cardenas y *Pereskia sparsiflora* F. Ritter (WFO, 2022). Por otro lado, comúnmente se conoce como Cuguchi, Cujuchi, Guyapa o Sacharosa (Anderson, 2001).

#### 1.1.1. Descripción botánica de *P. sacharosa*

Las plantas de *P. sacharosa* (Figura 1) son arbóreas o arbustivas y miden entre 5 y 7 m de altura, aunque pueden llegar a medir hasta 15 m. Sus tallos y ramas pueden ser rectos, pero a menudo se encuentran en zigzag. Sus hojas son muy variables en forma y tamaño; sin embargo, en su mayoría son obovadas u ovaladas, anchas y planas, dobladas a lo largo de la nervadura central, con pecíolos,

nervadura pinada, nervadura central prominente debajo, de 4 a 6 venas laterales, divergentes en ángulos y con un tamaño entre 3-12 cm de largo y 2-7 cm de ancho. Esta planta posee espinas sostenidas en racimos para esparcirse, muy robustas, de 1-4 cm de largo; estas también pueden encontrarse en los troncos. Las flores de *P. sacharosa* tienen forma de campana, pueden encontrarse solitarias o en inflorescencia y llegan a medir 37 cm de diámetro. Sus frutos emergen en forma de pera a globo, con un diámetro de 4-5 cm, de color verde o amarillo y suelen ser carnosos e indehiscentes, con semillas grandes y negras, sin embargo, no son comestibles (Anderson, 2001; Bravo Hollis, 1978; Mauseth & Landrum, 1997).



**Figura 1.** Características morfológicas de *P. sacharosa*. A) Fruto abierto y cerrado; B) hoja; C) tallo y espinas; D) espinas; E) botón floral.

**1.1.2. Usos y actividades biológicas del género Pereskia**

La parte comestible de estas plantas son las hojas y en algunas especies los frutos; sin embargo, su producción y comercialización no son comunes (Maciel et al., 2019). *P. aculeata* es una fuente importante de nutrientes, principalmente lípidos como el ácido linoleico, y puede utilizarse como

alimento nutritivo para poblaciones vulnerables por ingresos y carencias sociales (Almeida & Corrêa, 2012; Souza et al., 2014).

En varias partes del continente americano se utilizan las plantas del género *Pereskia* en la medicina tradicional. *P. aculeata* y *P. bleo* se han utilizado como medicinas contra el cáncer y se ha demostrado su actividad citotóxica (Malek et al., 2008; Tan et al., 2005), además de su actividad antimicrobiana (Souza et al., 2016; Wahab et al., 2008). En *P. lychnidiflora* se documentó actividad analgésica y antioxidante (Guerra et al., 2018). Otros usos tradicionales que se les da a las plantas del género *Pereskia* es en el tratamiento para la anemia, osteoporosis, enfermedades intestinales (García et al., 2019), enfermedades de la piel y cicatrización de heridas (Carvalho et al., 2014), tratamiento para dolores musculares, estomacales y de cabeza (Zareisedehizadeh et al., 2014), tratamiento para afecciones inflamatorias como la artritis reumatoide y el asma (Malek et al., 2008), así como antisifilíticos, expectorantes y emolientes (de Castro Campos Pinto & Scio, 2014).

Silva Torres et al. (2021) determinaron la capacidad neuroprotectora de extractos ricos en antioxidantes de hojas de *P. aculeata*, los cuales mostraron un alto potencial antioxidante en ensayos *in vitro* del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y Ferric reductor/antioxidant power (FRAP), así como inhibición de acetilcolinesterasa y lipooxigenasa, relacionadas con la actividad antiinflamatoria. Además, identificaron 11 compuestos de los extractos que pertenecen a terpenoides y compuestos fenólicos tales como el 2,4-diterbutilfenol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, fitol, vitamina E, fucosterol y lupeol.

Abdul-Wahab et al. (2012) evaluaron la actividad antinociceptiva de los extractos de etanol, hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol de *P. bleo* y vitexina en dos modelos analgésicos. En los análisis fitoquímicos se encontró vitexina, glucósido de  $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -sitosterol. No obstante, la actividad antinociceptiva fue moderada y la vitexina no mostró actividad. Sin embargo, Carvalho Guilhon et al. (2015) encontraron que fracciones de etanol, hexano, acetato de etilo o butanol, sitosterol y vitexina de *P. bleo*, si poseían un efecto antinociceptivo central en varios modelos analgésicos.

Por otro lado, De Castro Campos Pinto et al. (2015) también evaluaron la actividad antinociceptiva, pero de *P. aculeata* y encontraron que los extractos presentaban una antinocicepción central y periférica sin efecto opioide; además encontraron fitoquímicos como isómeros de triptamina, abrina, mescalina, hordenina, petunidina y quercetina. En *P. lychnidiflora*, Guerra et al. (2018) encontraron que el extracto etanólico de esta especie tiene un efecto analgésico similar al ibuprofeno que podría estar condicionado por la presencia de alcaloides, taninos y esteroides.

Finalmente, en otro estudio de Castro Campos Pinto et al. (2015) se investigó la actividad antiinflamatoria tópica de la fracción de hexano obtenida del extracto metanólico de hojas de *P.*

*aculeata* en modelos animales de dermatitis de oído aguda y crónica. Entre los resultados encontraron que se redujo el proceso inflamatorio evaluado mediante la reducción de los niveles de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  y glucocorticoides. Por lo tanto, esta especie posee actividad contra enfermedades inflamatorias agudas y crónicas.

Las hojas y frutos de *P. sacharosa* se emplean para tratar trastornos de la piel y el dolor de oído, mientras que las espinas se utilizan contra el dolor muscular (Hajdu & Hohmann, 2012). En un estudio realizado por Ruiz-Velasco-Martínez et al. (2022), se evaluó la actividad antinociceptiva de *P. sacharosa* evaluada mediante la prueba de formalina en ratones, y se encontró que el extracto etanólico y dos fracciones de dicho extracto de *P. sacharosa* poseen dicha actividad tanto en las fases neurogénica como inflamatoria. Además, identificaron la presencia de camferol, un flavonoide al que se le atribuye tanto actividad antinociceptiva como antiinflamatoria. Sin embargo, no existe información sobre la actividad antiinflamatoria y neuroprotectora de *P. sacharosa*, pero para otras plantas del mismo género, ya se han evaluado dichas capacidades.

### **1.1.3. Composición química del género *Pereskia***

En las plantas más comunes de *Pereskia*, como *P. aculeata*, *P. bleo* y *P. grandifolia*, se han realizado estudios para evaluar los metabolitos presentes en éstas; en general, se han identificado esteroides, carotenoides, compuestos fenólicos y alcaloides (Agostini-Costa et al., 2012; Egea & Pierce, 2021; Guerra et al., 2018; Nurestri et al., 2009; Zareisedehizadeh et al., 2014).

Las hojas de *P. aculeata* son una fuente abundante de vitamina C, carotenoides ( $\alpha$  y  $\beta$ -carotenos,  $\alpha$  y  $\beta$ -criptoxantinas, luteína y zeaxantina) y xantofilas (Agostini Costa et al., 2012). Entre los compuestos bioactivos reportados para las hojas de *P. aculeata* se encuentran fitoesteroides como estigmasterol, sitosterol y 24-metilcolesterol, así como compuestos fenólicos tales como el ácido caftárico, la rutina y la narcisina (Egea & Pierce, 2021). Además, el aceite esencial contiene principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, hidrocarburos y fitol; compuestos que comúnmente se encuentran en hierbas culinarias y de la medicina tradicional (Egea & Pierce, 2021).

Por otro lado, *P. bleo* también posee una alta cantidad de metabolitos bioactivos como alcaloides (tiramina, 3-metoxitiramina y 3,4-dimetoxi- $\beta$ -feniletilamina), flavonoides (vitexina), fitoesteroides (glucósido de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol), lactonas, compuestos fenólicos (2,4-ditertbutilfenol,  $\alpha$ -tocoferol, catequina, epicatequina, quercetina y miricetina), terpenoides (fitol) y carotenoides (luteína y zeaxantina) (Zareisedehizadeh et al., 2014).

En *P. grandifolia* se han encontrado  $\beta$ -sitosterol, fitona y 2,4-ditertbutilfenol, compuestos presentes en extractos evaluados para su capacidad antioxidante (Nurestri et al., 2009). Finalmente, en *P. lychnidiflora* se han encontrado alcaloides, taninos y terpenoides (Guerra et al., 2018).

Todos los metabolitos mencionados son fitoquímicos que pueden proporcionar beneficios a la salud con respecto al cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión arterial, enfermedades inflamatorias, infecciones y enfermedades mentales, entre otras (Dillard & German, 2000).

### **1.2. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

El cultivo de tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas que permiten cultivar cualquier parte de una planta (células, tejidos u órganos) en medios artificiales, en condiciones asépticas y en entornos controlados (Loyola Vargas & Ochoa Alejo, 2018). Este conjunto de técnicas surgió como un enfoque experimental para demostrar la teoría celular, que establece que el concepto de totipotencia (potencial genético de una célula para generar un organismo multicelular completo) (Loyola Vargas & Ochoa Alejo, 2018).

Para realizar este tipo de cultivos se requiere de un medio de cultivo altamente nutritivo, así como el uso de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como fitohormonas, las cuales son determinantes para el establecimiento exitoso de cultivos de tejidos vegetales (Neumann & Jafargholi Imani, 2009). Mediante el uso de los RCV en diferentes combinaciones y concentraciones, se puede controlar la morfogénesis en los cultivos, ya que permite la regeneración de plantas enteras, el cultivo exclusivo de ciertos órganos como raíces, el cultivo de tejido caloso, la diferenciación en órganos de distintos explantes (organogénesis), la dediferenciación a embriones (embriogénesis), así como el cultivo de células vegetales en suspensión (Neumann & Jafargholi Imani, 2009).

Estos cultivos proporcionan una nueva tecnología para realizar mejoras genéticas de plantas, conservación de germoplasma y producción de un amplio número de variedades nuevas y libres de enfermedades; así como la producción de semillas artificiales, productos biofarmacéuticos, proteínas recombinantes u otras proteínas terapéuticas, plantas transgénicas y vacunas o anticuerpos (Bhatia & Sharma, 2015).

### **1.2.1. Micropropagación**

La micropropagación, es una técnica que permite la rápida propagación de individuos genéticamente idénticos de manera *in vitro*, es decir en condiciones controladas y asépticas (Cardoso et al., 2018). De esta forma, un solo explante puede generar un gran número de plantas y, además, se necesita relativamente poco espacio (Cardoso et al., 2018).

La micropropagación es un proceso de varios pasos (Saran et al., 2013):

- Etapa 0: es la etapa preparatoria para proporcionar explantes de calidad de una planta de invernadero o de campo.
- Etapa 1: inicio de cultivos asépticos, lo que involucra la desinfección de los explantes a utilizar, o bien, se puede iniciar a partir de cultivos que ya se encuentren *in vitro*.
- Etapa 2: multiplicación, generación de brotes a partir de los explantes, ya sea por organogénesis, embriogénesis o a partir de meristemas.
- Etapa 3: climatización y enraizamiento de brotes formados *in vitro*.
- Etapa 4: trasplante, transferencia de plantas a invernadero o condiciones de campo.

### **1.2.2. Cultivo de tejido calloso**

El tejido calloso es una masa irregular de tejido parenquimatoso con meristemas, o bien, con células indiferenciadas (Bhatia, 2015). Este tipo de tejido carece de una estructura organizada, pero si puede llegar a mostrar diferenciación celular; además, suelen ser muy heterogéneos, ya que los callos de un mismo explante pueden presentar variaciones en cuanto a color, textura, contenido de agua y potencial morfogénico, y esto depende del explante, las condiciones de cultivo y el paso del tiempo (Saran et al., 2013).

En la naturaleza, varias plantas desarrollan tejido calloso debido a la alteración en los niveles endógenos de sus RCV causados por la cicatrización de lesiones en los tejidos, infecciones por microorganismos, (como la agalla de la corona causada por *Agrobacterium tumefaciens*) o recombinaciones genéticas específicas (tumores genéticos) (Neumann & Jafargholi Imani, 2009). Por lo tanto, cuando se quiere establecer un cultivo de callos *in vitro*, se debe aplicar uno o más RCV en el medio de cultivo y el callo comienza a formarse donde se realizaron los cortes del explante (lesiones) (Dar et al., 2021). Cuando ya existe suficiente tejido calloso, este se separa del explante original y se transfiere a un medio fresco de la misma composición (Neumann & Jafargholi Imani, 2009; Saran et al., 2013).

El tejido del callo puede volverse progresivamente friable con subcultivos repetidos en medio de cultivo (Saran et al., 2013). La friabilidad, consiste en la capacidad del callo para disgregarse o bien,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

para que las células se separen unas de otras fácilmente (Dar et al., 2021). Esta capacidad es deseable para el mantenimiento del tejido y producir una suspensión celular fina en un medio líquido (Saran et al., 2013).

Los cultivos de callos tienen varias aplicaciones, algunas de ellas es que sirven como material inicial para cultivos en suspensión (Partap et al., 2022), proporcionan un sistema para estudios morfogénéticos y fisiológicos (Bhatia & Sharma, 2015), y producen metabolitos secundarios con actividad biológica que pueden ser iguales a los de la planta completa (Li et al., 2022). Además, con la ingeniería genética, también es posible obtener plantas y callos modificados que puedan producir, en mayor cantidad, distintos compuestos bioactivos, proteínas (incluidos anticuerpos, sustitutos de sangre y vacunas) (Bhatia & Dahiya, 2015). Recientemente, la producción de proteínas y compuestos bioactivos en plantas transgénicas se ha convertido en una alternativa viable a los sistemas de producción convencionales, como la fermentación microbiana o el cultivo de células de mamíferos (Bhatia & Dahiya, 2015). Estas aplicaciones se han logrado llevar a escala industrial (Bhatia & Sharma, 2015).

### **1.2.3. Cultivos de tejido calloso en plantas del género *Pereskia***

De Aguiar Lage et al (2015), establecieron un cultivo de callos con hojas de *P. aculeata* en medio suplementado con el RCV ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram). Obtuvieron callos friables y pigmentados de color rojo, los cuales fueron utilizados para establecer un cultivo de células en suspensión y, además, obtener y caracterizar betalainas, proporcionando así una nueva fuente de producción de betalaina con fines comerciales. Por otro lado, el uso de Picloram junto con 6-bencilaminopurina (BAP) o cinetina indujo la oxidación celular del tejido calloso.

Macías Martínez (2017) estableció cultivos de callo en *P. sacharosa* y *P. lychnidiflora*. Para *P. sacharosa* obtuvo tejido friable con ácido naftalenacético (ANA) y tiazurón (TDZ); el color de los callos varió desde amarillo hasta verde en un mismo cultivo. Para *P. lychnidiflora*, el tejido tuvo un crecimiento muy lento y con poca friabilidad.

### **1.3. El lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas**

El LPS, también denominado endotoxina, es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, como *E. coli* (Raetz & Whitfield, 2002). Estas moléculas, cargadas negativamente consisten en un lípido conservado y polisacáridos u oligosacáridos unidos a este dominio, por lo que se considera un glicolípido complejo, el cual participa en varias funciones de la

bacteria como en la virulencia, interacción huésped-patógeno, permeabilidad de la membrana externa y resistencia a antibióticos. (Raetz & Whitfield, 2002).

Las bacterias Gram-negativas tienen dos membranas separadas entre sí por un espacio acuoso, denominado periplasma (Sperandeo et al., 2019). La membrana citoplasmática o interna es una bicapa de fosfolípidos clásica, mientras que la membrana externa es altamente asimétrica, contiene fosfolípidos en la valva interna y LPS en la valva externa, el cual cubre más del 90% de su superficie (Sperandeo et al., 2019). Una de las funciones de la membrana externa es servir como la primera barrera física, proporcionando a las bacterias protección contra agentes antibacterianos (Rosenfeld & Shai, 2006).

El LPS es el principal responsable de las propiedades distintivas de permeabilidad de la membrana externa, es eficaz contra muchas moléculas tóxicas y proporciona resistencia a una gran cantidad de antibióticos; además de ser un factor de virulencia importante y juega un papel preponderante en la interacción huésped-patógeno al modular la respuesta inmune innata (Sperandeo et al., 2019).

### **1.3.1. Estructura del LPS**

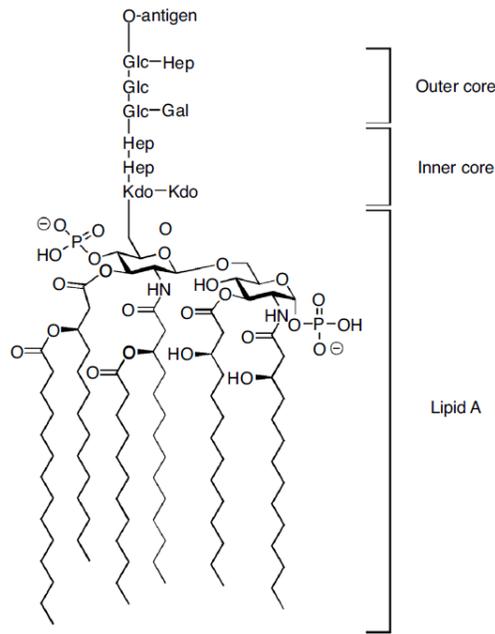
El LPS está organizado en tres dominios estructurales: lípido A, un oligosacárido central o núcleo de oligosacáridos y un antígeno O altamente variable, compuesto de unidades de oligosacárido repetidas, que puede o no estar presente (Figura 2) (Bertani & Ruiz, 2018).

El lípido A es la sección hidrófoba que ancla el LPS a la valva exterior de la membrana externa (Raetz et al., 2009). Por ejemplo, en *E. coli*, la membrana externa consiste de un disacárido de glucosamina que se fosforila en las posiciones 1 y 4 y contiene seis cadenas de acilo unidas mediante un enlace amida y un enlace éster (Raetz et al., 2007). Este lípido A es la porción más conservada de la molécula, aunque existen variaciones entre especies con respecto a la longitud y el número de cadenas de acilo (Raetz et al., 2007, 2009).

El núcleo de oligosacáridos está unido covalentemente al lípido A y, a menudo, se divide en un núcleo interno y un núcleo externo (Simpson & Trent, 2019). La estructura química del núcleo externo es variable, mientras que el núcleo interno está conservado, ya que contiene al menos un residuo de ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo), que une el núcleo interno al lípido A (Bertani & Ruiz, 2018). Este núcleo es la parte del LPS más importante ya que es el responsable de las funciones de permeabilidad de la membrana, resistencia a antibióticos e interacción huésped-patógeno (Bertani & Ruiz, 2018).

El antígeno O, está compuesto por unidades repetidas de uno a seis residuos diferentes de oligosacáridos (Bertani & Ruiz, 2018). Esta parte está expuesta al entorno extracelular y es

responsable de las propiedades inmunogénicas; además, es la parte más variable; existen bacterias que no presentan antígeno O en sus LPS (Bertani & Ruiz, 2018).



**Figura 2.** Estructura general del LPS. Outer core, es el núcleo externo de la molécula, su estructura es variable y puede contener o no al antígeno O. Inner core, es el núcleo interno de la molécula y se encuentra más conservado que el núcleo externo ya que contiene moléculas de Kdo que se unen al lípido A. Tomado de: Sweeney & Lowary, 2019.

La biosíntesis de LPS comienza en la interfaz citoplasmática de la membrana interna y luego se transporta a la externa, por medio de una serie de pasos enzimáticos que conforman la vía de Raetz (Simpson & Trent, 2019). Primero se produce el lípido A en la membrana interna, para después unirse al núcleo de oligosacáridos produciendo un lipooligosacárido (LOS) (Simpson & Trent, 2019). Los precursores del antígeno O se sintetizan por separado, también en la membrana interna del lado del citoplasma, y se unen a un transportador lipídico, para después agregarse a LOS en el periplasma (Sweeney & Lowary, 2019). Las moléculas de LPS o LOS son luego translocadas a la superficie de la membrana externa por medio de un transportador (Sweeney & Lowary, 2019).

Las propiedades de los LPS afectan la permeabilidad de la membrana externa, la resistencia a los antibióticos, la virulencia y el reconocimiento por parte del sistema inmunológico del huésped (Simpson & Trent, 2019). Debido a los entornos dinámicos en los que se desenvuelve la célula bacteriana, las bacterias han desarrollado muchas enzimas que modifican la estructura del LPS, lo

cual, entre otras cosas, mejora las propiedades del LPS y las vuelve más resistentes a los antibióticos (Simpson & Trent, 2019).

### **1.3.2. Funciones del LPS en la bacteria**

La complejidad estructural del LPS refleja las muchas funciones que realiza esta molécula en la célula bacteriana. Una de sus funciones principales es su papel en la permeabilidad de la membrana externa gracias a su naturaleza anfipática; el lípido A, al ser hidrófobo, proporciona una barrera al flujo de moléculas hidrófilas, mientras que el núcleo de oligosacáridos y el antígeno O son hidrófilos, y proporcionan una barrera contra el paso de compuestos hidrófobos (Nikaido, 2003). Además, se cree que las cadenas alifáticas del LPS, las cuales están completamente saturadas, crean un interior lipídico de baja fluidez y contribuyen aún más a la baja permeabilidad de los solutos hidrófobos (Nikaido, 2003). De la misma forma, las propiedades de la membrana externa también son consecuencia de la capa compacta de moléculas de LPS unidas por la acción de los cationes divalentes  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , los cuales contrarrestan la repulsión entre los fosfatos cargados negativamente; esto permite a las bacterias Gram-negativas colonizar muchos ambientes diferentes (Carpenter et al., 2016).

Las moléculas de LPS participan en las interacciones huésped-patógeno. El antígeno O, la porción más externa y variable de la molécula, protege a las bacterias de la fagocitosis y la lisis; el lípido A es reconocido por el sistema inmunológico innato que inicia una cascada de señales que conduce a la producción de citocinas inflamatorias, proceso importante para la eliminación de la infección (Kagan, 2017). Por lo tanto, el LPS es un patrón molecular asociado a patógenos bien caracterizado, es decir, es la “firma” de las bacterias Gram-negativas, interpretada por el sistema inmunológico como un signo de infección (Kagan, 2017). Este proceso se explicará con más detalle posteriormente. No obstante, es importante destacar que las modificaciones al LPS, en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, pueden proporcionar la capacidad de evadir el reconocimiento por el sistema inmunológico y mejorar la virulencia del patógeno (Maldonado et al., 2016).

Sumado a las propiedades anteriores, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas sirve como la primera barrera que encuentran los péptidos antimicrobianos (liberados por el sistema inmunológico del huésped) y los antibióticos, por lo que necesitan atravesarla para alcanzar la membrana interna (Peschel & Sahl, 2006). Inicialmente, estos compuestos interactúan con el exterior del LPS y, al ser anfipáticos o catiónicos, desplazan competitivamente los cationes divalentes que neutralizan la carga negativa del LPS (Moffatt et al., 2019). Posteriormente, se insertan en la membrana formando poros y comprometiendo su permeabilidad, lo que permite su entrada y la ruptura de la membrana interna dando lugar a la lisis celular (Moffatt et al., 2019).

### **1.3.3. El LPS en *E. coli***

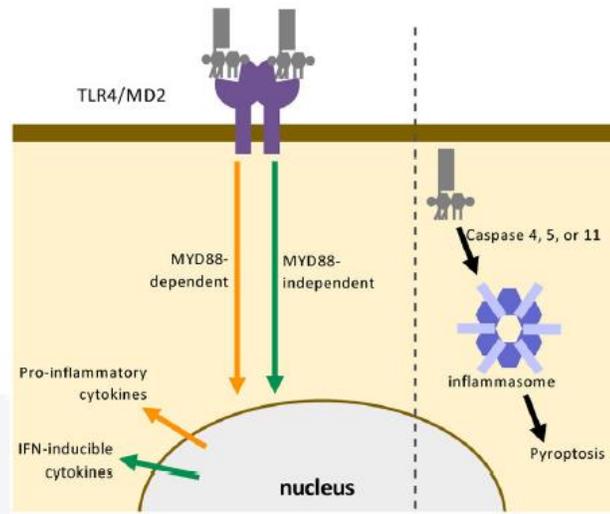
*E. coli* es una bacteria Gram-negativa la cual ha sido utilizado como un modelo clásico en estudios biológicos y biotecnológicos. Además, esta bacteria es parte de la flora intestinal de los seres humanos y algunos animales, sin embargo, existen cepas de *E. coli* patogénicas, responsables de una gran variedad de infecciones (Chaudhuri & Henderson, 2012).

El tratamiento terapéutico de las infecciones por *E. coli* se ve amenazado por la aparición de resistencia a los antibióticos gracias a las modificaciones al LPS (Paitan, 2018).

Dada la variabilidad del antígeno O, el LPS se utiliza para identificar cepas distintas de la misma bacteria a través de la serotipificación (Liu et al., 2020). Existen cepas de *E. coli* que no sintetizan el antígeno O, principalmente las utilizadas en laboratorio, las cuales se denominan cepas "rugosas", contrario a las cepas "suaves" de tipo silvestre (Liu et al., 2020). El antígeno O está expuesto en la superficie celular y es altamente inmunogénico, por lo que también es un factor de virulencia importante (Liu et al., 2020).

### **1.3.4. El LPS y la respuesta inflamatoria**

Al ser la parte conservada del LPS, el lípido A es detectado por el receptor tipo-"Toll" 4 (TLR4, por sus siglas en inglés, toll= vigilante) asociado al factor de diferenciación mieloide 2 (MD2, por sus siglas en inglés), los cuales forman un complejo proteico transmembranal, dando el inicio de la respuesta inflamatoria innata (Aldapa Vega et al., 2016). En los macrófagos, la activación del TLR4 desencadena la biosíntesis de diversos mediadores de la inflamación, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), además de activar la producción de moléculas coestimuladoras necesarias para la respuesta inmune adaptativa (Aldapa Vega et al., 2016). Todos estos eventos son indispensables para eliminar infecciones locales (Aldapa Vega et al., 2016; Kagan, 2017). Un resumen de este proceso se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Respuesta inflamatoria al LPS dentro de la célula. El LPS está representado por las estructuras color gris unidas a TLR4/MD2 (color morado) en la membrana celular; esta acción desencadena una serie de eventos dependientes o independientes de MyD88 que resultarán en la transcripción y traducción de citocinas proinflamatorias, citocinas inducibles por IFN, así como factores de transcripción de éstas. Por otro lado, el LPS (gris) dentro de la célula desencadena la vía del inflamosoma a través de caspasas que terminan en piroptosis. TLR4= receptor tipo-“Toll” 4; MD2= factor de diferenciación mieloide tipo 2; MyD88-dependent= vía dependiente de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; MyD88-independent= vía independiente de MyD88; IFN= interferón. Tomado de: Simpson & Trent, 2019.

Inicialmente, el LPS se extrae de la membrana externa de la bacteria por la proteína de unión a LPS (LBP, por sus siglas en inglés). Después, la LBP transfiere el LPS a su receptor, la proteína de diferenciación CD14, una glicoproteína de superficie de la membrana en las células del huésped. CD14 divide al LPS en moléculas monoméricas y las presenta al complejo TLR4/MD2. Debido a su naturaleza anfipática, las moléculas de LPS, forman grandes agregados en ambientes acuosos y por eso requieren de las proteínas accesorias, LBP y CD14 antes de su presentación a TLR4/MD2. CD14 también juega un papel fundamental en la endocitosis del complejo TLR4-MD2/LPS y en la señalización intracelular posterior (Cochet & Peri, 2017; Raetz & Whitfield, 2002).

La formación del complejo TLR4-MD2/LPS, da como resultado la dimerización del dominio citosólico de homología Toll/IL-1R (TIR) y su acumulación en la membrana celular. Los dominios TIR inician la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88, por sus siglas en inglés)-dependiente de señalización mediante una proteína adaptadora del dominio TIR (TIRAP, por sus siglas en inglés), que promueve las respuestas inflamatorias dependientes del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras  $\kappa$  de las células B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés) (Park & Lee, 2013).

En ausencia de LPS el NF- $\kappa$ B se encuentra en forma inactiva unido a un inhibidor (I $\kappa$ B). Tras la formación de la vía dependiente de MyD88, enzimas quinasas rompen el I $\kappa$ B formando el NF- $\kappa$ B y lo activan. Posteriormente, se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria generando la transcripción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Park & Lee, 2013; Romero Hurtado & Iregui, 2010).

Por otro lado, se activa una vía independiente de MyD88 por medio de la proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón  $\beta$  (TRIF, por sus siglas en inglés) por medio de la molécula adaptadora relacionada con el TRIF (TRAM, por sus siglas en inglés). Esto concluye en la activación del NF- $\kappa$ B y la transcripción de interferones tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1a y  $\beta$ 1b) (Park & Lee, 2013; Romero Hurtado & Iregui, 2010).

Otra respuesta del sistema inmunológico al LPS es la formación de un inflamosoma. Los inflamosomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en el citosol en respuesta a la invasión microbiana o daño celular e inducen la muerte celular y la liberación de IL-1 $\beta$ , la cual es conocida como piroptosis. Este proceso se realiza a través de caspasas, las cuales se activan por medio de vesículas de la membrana externa extracelular que se desprenden de las bacterias Gram-negativas durante la replicación y son reconocidas por una citocina llamada interferón (INF, por sus siglas en inglés) (Barker & Weiss, 2019).

La finalidad de las vías mencionadas anteriormente es provocar una respuesta inmune innata para prepararse ante una infección y eliminarla, así como a las células ya infectadas; así como activar la respuesta adaptativa para reconocer futuras infecciones (Raetz & Whitfield, 2002). Una respuesta inflamatoria exacerbada sistémicamente puede provocar una sepsis, en donde las citocinas y factores de coagulación pueden dañar los vasos sanguíneos y provocar un choque séptico, acompañado de coagulación intravascular diseminada y fallo multiorgánico (Raetz & Whitfield, 2002).

#### **1.4. La neuroinflamación**

La inflamación es un proceso biológico clave en respuesta a las lesiones, infecciones y traumas que sufren las células o los tejidos (Shabab et al., 2017). No obstante, en el SNC, puede ser un factor que contribuya negativamente a los trastornos cerebrales. Por lo tanto, las neuronas realizan esfuerzos neuroprotectores para combatir el lado negativo de la inflamación al eliminar los desechos celulares y regular la secreción de moléculas inflamatorias (Shabab et al., 2017).

Muchas investigaciones en los últimos años se han dedicado a investigar como ocurre la respuesta inflamatoria en el SNC, ya que el conocimiento de las cascadas de eventos involucrados en enfermedades neurodegenerativas crónicas de progresión lenta ha sido fundamental para el

descubrimiento de tratamientos farmacológicos para estas (enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis, etc.) y otras enfermedades inflamatorias (Schain & Kreisl, 2017; Wood, 2003).

#### **1.4.1. Respuesta neuroinflamatoria**

La neuroinflamación es una respuesta que involucra a todas las células presentes en el SNC, y en particular a las células gliales (Yang & Zhou, 2019). La neuroinflamación está mediada por la producción de citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y mensajeros secundarios, los cuales son producidos por la glía (microglía y astrocitos), las células endoteliales y las células inmunitarias (Yang & Zhou, 2019).

La microglía son los macrófagos cerebrales clave en la inflamación; ésta se activa en presencia de patógenos, daño tisular, neurotoxinas, infecciones o lesiones (Yang & Zhou, 2019). Después de activarse la microglía, prolifera, realiza fagocitosis, presenta antígenos a las células T y activa varios genes y proteínas, incluyendo mensajeros como el óxido nítrico y las prostaglandinas, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  y ROS, entre otros compuestos que causan disfunción neuronal y muerte celular (DiSabato et al., 2016). En términos de neuroinflamación crónica, estas células pueden permanecer activas durante períodos prolongados (DiSabato et al., 2016).

La microglía activada puede eliminar patógenos y también producir muerte neuronal mediante fagocitosis; además, muchas vías proapoptóticas están mediadas por moléculas de señalización que se producen en exceso, lo cual sugiere que la neuroinflamación podría influir directamente en la apoptosis neuronal y activar la microglía (Shabab et al., 2017).

La respuesta inflamatoria comienza con los receptores TLR, tal como TLR4 para el LPS. Por lo tanto, se activa la vía de NF- $\kappa$ B, formando una cascada que comienza fuera de las células y termina en el núcleo celular, incrementando la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. En todas las células eucariotas, la mayoría de las señales extracelulares, incluidas las infecciones, otras citocinas inflamatorias y situaciones de estrés, pueden activar NF- $\kappa$ B para controlar procesos como la inflamación, la apoptosis, la inmunidad y la supervivencia celular. No obstante, la activación de NF- $\kappa$ B en las células gliales juega un papel neurodegenerativo importante al eliminar también a las neuronas sanas (Shabab et al., 2017).

Las funciones de la microglía relacionadas con la respuesta inmune innata están asociadas con la señalización de TNF- $\alpha$  y su regulación tanto en la inflamación como en la apoptosis. Se han observado aumentos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  antes de la muerte neuronal, debido a la activación exacerbada de la microglía y la respuesta inflamatoria crónica (Shabab et al., 2017).

Alternativamente, la actividad de la respuesta inmune en el SNC se puede valorar mediante la activación de la expresión del gen cFos, un gen de respuesta temprana inducido por una amplia gama de estímulos y se ha utilizado como un marcador de la actividad neural. Esto se debe a que las sustancias que interactúan con receptores en la membrana celular pueden alterar los niveles de segundos mensajeros, mediante la modulación de cambios en las tasas de fosforilación o alteraciones en la entrada de iones como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), lo que induce la expresión de genes específicos (Joo et al., 2016; Sheng & Greenberg, 1990). Se ha evaluado la actividad de cFos en el aprendizaje (Jaworski et al., 2018), las adicciones (Cruz et al., 2015) y en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Herrera & Robertson, 1996; Huffman et al., 2019); todo esto mediante análisis de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Berghorn et al., 1994).

#### **1.4.2. Papel del LPS en la neuroinflamación**

La unión de LPS a TLR4 en la superficie de la microglía activa varias vías de transducción de señales, incluidas la vía dependiente e independiente de MyD88, entre otras vías como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), que al final, conducen a la activación de NF- $\kappa$ B y a su vez, a la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) y ciclooxigenasas para la síntesis de prostaglandinas (COX-1 y COX-2), que en conjunto dan como resultado neuroinflamación (Alvares Batista et al., 2019; Hoogland et al., 2015).

En resumen, LPS induce la producción de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IL-18 y TNF- $\alpha$ ; glutatión, quimiocinas, NF- $\kappa$ B, iNOS, entre otras (Lopes, 2016; Nava Catorce & Gevorkian, 2016).

### **1.5. Estructuras importantes en el SNC**

#### **1.5.1. Ventriculos cerebrales**

El sistema ventricular se compone de un conjunto de cavidades contiguas que producen y circulan al líquido cefalorraquídeo (LCR) dentro del cerebro (Brodbelt & Stoodley, 2007). El LCR se produce dentro del sistema ventricular por células ependimales especializadas conocidas como plexo coroideo (Sakka et al., 2011). Este líquido viaja a través del sistema ventricular de forma rostro caudal unidireccional, pasando por el orificio del acueducto mesenfálico de Silvio, y finalmente, el cuarto ventrículo se comunica con el espacio subaracnoideo craneal y espinal, que es la ubicación predominante de la reabsorción del LCR (Brodbelt & Stoodley, 2007).

El tercer ventrículo se encuentra rodeado por los núcleos mediales de cada tálamo y el hipotálamo, específicamente el núcleo arcuato del hipotálamo (Stratchko et al., 2016). Los cuerpos de los ventrículos laterales están situados por encima del tálamo, mientras que el piso se compone de varias estructuras, incluido el hipocampo (Scelsi et al., 2020; Stratchko et al., 2016).

El LCR sirve para muchos propósitos, incluida la protección mecánica y la regulación de la homeostasis; sin embargo, otra de sus funciones importantes es permitir el movimiento de metabolitos, toxinas y nutrientes, como el LPS, así como los metabolitos de extractos vegetales con actividad biológica (Brodbelt & Stoodley, 2007). Esto se debe a que los ventrículos están revestidos por una capa continua de células endoteliales y tanicitos, los cuales son células gliales expuestas al LCR y tienen acceso a los metabolitos y hormonas del plasma, a través de capilares fenestrados (Goodman & Hajihosseini, 2015). De hecho, algunos tanicitos actúan como conductos para el tráfico de estas moléculas hacia el parénquima cerebral (Goodman & Hajihosseini, 2015).

### **1.5.2. Hipotálamo y núcleo arcuato**

El hipotálamo es una sección ubicada en la base del cerebro, cercana al tercer ventrículo que controla procesos fisiológicos incluida la homeostasis del equilibrio energético, los ritmos circadianos y las respuestas al estrés, así como los comportamientos reproductivos y de crecimiento, principalmente a través de hormonas. Sus funciones van de la mano con la hipófisis productora de hormonas (Burbridge et al., 2016). Además, el tálamo, en general, es una estación de retransmisión clave para la transmisión de información nociceptiva a la corteza cerebral (Yen & Lu, 2013).

El núcleo arcuato se localiza en el hipotálamo mediobasal y forma una entidad morfológica y funcional con la eminencia mediana (Korf & Møller, 2021). Este contiene varios tipos de neuronas que controlan la liberación de prolactina, la ingesta de alimentos y el metabolismo y se encuentran adyacentes a la pared del tercer ventrículo, lo que facilita el intercambio de señales desde y hacia el LCR a través de los tanicitos (Korf & Møller, 2021).

### **1.5.3. Hipocampo**

El hipocampo es una estructura cerebral temporal perteneciente al lóbulo límbico, cuya formación del hipocampo sobresale en el suelo del ventrículo lateral y está formado por tres subcampos principales (CA1, CA2 y CA3) (Tatu & Vuillier, 2014). Está fundamentalmente involucrado en el procesamiento de la memoria, el aprendizaje, las emociones y la información espacial (Schultz & Engelhardt, 2014). Además, juega ciertos papeles en la regulación de la ingesta de alimentos, así como en las actividades cognitivas (Stevenson & Francis, 2017).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inflamatoria es una reacción fisiopatológica normal de un organismo al daño causado por diversas causas de naturaleza biológica, química, física o psicológica. No obstante, las enfermedades inflamatorias, incluidas las neurológicas, son una respuesta excesiva o crónica a dicho proceso, por lo que muchas investigaciones están destinadas a la búsqueda de tratamientos preventivos y curativos ante este tipo de enfermedades.

Por otro lado, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas patologías es bien aceptado alrededor del mundo. En particular, las especies del género *Pereskia* son utilizadas en varias regiones del continente americano para tratar heridas en la piel, enfermedades gastrointestinales e incluso se utiliza para el tratamiento del cáncer. Esto se debe al perfil fitoquímico de las plantas medicinales, ya que poseen diversos tipos y cantidades de metabolitos secundarios que tienen actividad biológica en el cuerpo humano con una gran variedad de aplicaciones. La información sobre la actividad biológica, especialmente la actividad antiinflamatoria, que tiene *P. sacharosa* es limitada, por lo que la información obtenida en la presente tesis sentará las bases para investigaciones futuras.

Los objetivos y metas de éste proyecto se posicionan en el objetivo tres sobre “*Salud y bienestar*” de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), el cual corresponde a “*garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades*”, con el cual se busca reducir la mortalidad de una gran variedad de enfermedades, así como mejorar el acceso a la salud en países vulnerables por ingresos y carencias sociales. De la misma forma, se ubica también dentro del objetivo: “Salud: promoción de la salud, medicina preventiva y atención médica, primordialmente en cáncer, diabetes y obesidad, salud comunitaria, medicina natural, insuficiencia renal crónica, inmunoterapias y enfermedades cardio y cerebro-vasculares” de los Programas Nacionales Estratégicos (PRONACES) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

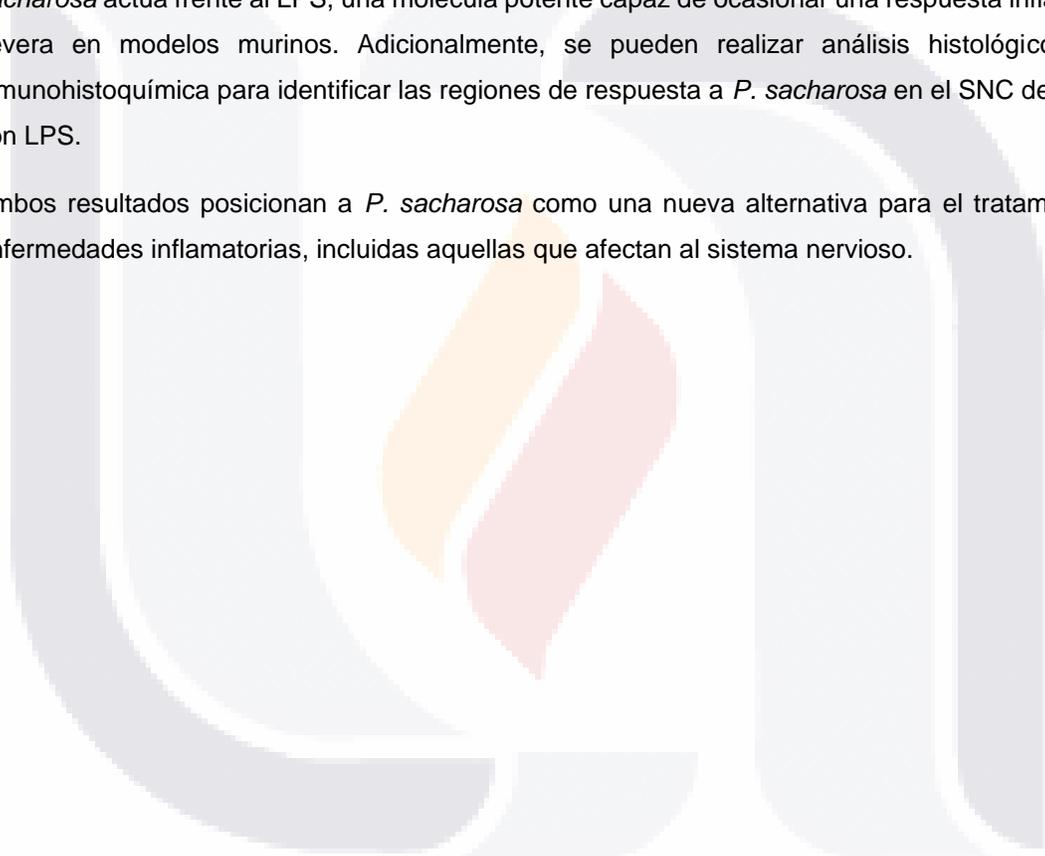
El estudio de los metabolitos secundarios en plantas medicinales, además de justificar el uso de dichas plantas, contribuirá al interés comercial, principalmente en el área farmacéutica. Este tipo de plantas pueden ser utilizadas como nutraceuticos, o bien, pueden utilizarse como biofábricas de metabolitos secundarios, que posteriormente sean utilizados como fármacos para tratar diversas enfermedades.

Además, existen técnicas biotecnológicas que tienen la finalidad de preservar especímenes que se encuentran en el ecosistema, tal es el caso de los cultivos in vitro de plantas y tejido calloso de éstas, el cual tiene la capacidad de crecer en cortos periodos de tiempo y además sintetizar los metabolitos secundarios presentes en la planta completa que puedan tener actividad biológica. Esto se ubica

dentro del objetivo 15 “Vida de Ecosistemas Terrestres” de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU, en donde una de sus metas es “poner freno a la pérdida de la diversidad biológica” entre otras acciones; así como el objetivo “Sistemas socioecológicos y sustentabilidad” de PRONACES-CONACyT.

Dicho esto, es relevante realizar un análisis del perfil fitoquímico de *P. sacharosa* con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios presentes en ésta. Este análisis puede realizarse mediante diversas técnicas cromatográficas simples y complejas. Además, es necesario evaluar la actividad antiinflamatoria en los extractos de *P. sacharosa* y estudiar los mecanismos de acción en la que *P. sacharosa* actúa frente al LPS, una molécula potente capaz de ocasionar una respuesta inflamatoria severa en modelos murinos. Adicionalmente, se pueden realizar análisis histológicos y de inmunohistoquímica para identificar las regiones de respuesta a *P. sacharosa* en el SNC de ratones con LPS.

Ambos resultados posicionan a *P. sacharosa* como una nueva alternativa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluidas aquellas que afectan al sistema nervioso.



### 3. HIPÓTESIS

El extracto etanólico y las fracciones de *P. sacharosa* poseen actividad antiinflamatoria en el SNC de ratas Wistar y de las cepas murinas CD1 y C57BL/6JN en respuesta al LPS de *E. coli* (O127:B8).

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y de las fracciones de *P. sacharosa* en el SNC de ratas Wistar, ratones CD1 y C57BL/6JN expuestos al LPS de *E. coli* (O127:B8).

#### 4.2. Objetivos Específicos

- Establecer cultivos *in vitro* de callos de *P. sacharosa* mediante el uso de RCV.
- Separar e identificar compuestos fenólicos en el extracto etanólico de callos y hojas de *P. sacharosa* por métodos cromatográficos.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico y de las fracciones obtenidas de *P. sacharosa* en el SNC de ratas Wistar y las cepas CD1 y C57BL/6JN de ratones expuestos al LPS de *E. coli*, grado reactivo O127:B8.
- Identificar el ARN mensajero para cFos, como gen de respuesta temprana en el SNC y de CD14, como el receptor de LPS activado en el modelo experimental.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Propagación *in vitro* de *P. sacharosa*

Plantas de *P. sacharosa* obtenidas *in vitro* del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes fueron utilizadas para su propagación. Explantes de 5 cm de tallo de plántulas de *P. sacharosa* se inocularon en frascos con 100 mL de medio basal Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) sólido adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y suplementado con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA; PhytoTech Labs®, Kansas, EE. UU.). El pH se ajustó a 5.7 con ácido clorhídrico 0.1 N (HCl, Macron Fine Chemicals™, Estado de México, México) e hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH, Productos Químicos de Monterrey, Monterrey, México) 0.1 N, antes de añadir 8 g L<sup>-1</sup> de agar (Sigma-Aldrich® Co., Madrid, España) y, posteriormente, los frascos se esterilizaron en una autoclave LS-B35L (Labtronic Scientific, Ciudad de México, México) a 120 °C y 15 PSI durante 20 min. Se inoculó un explante por frasco, en condiciones asépticas, y se mantuvieron a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 h. Se realizaron subcultivos de las plántulas en medio fresco con la misma composición cada 21 días (Galvan, 2016). Estas plántulas se utilizaron para la inducción de tejido calloso.

### 5.2. Inducción y establecimiento de cultivos *in vitro* de tejido calloso

Explantes de hoja y tallo de *P. sacharosa* se inocularon en frascos con 20 mL de medio MS sólido adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y suplementados con 2.41 mg L<sup>-1</sup> de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram; Sigma-Aldrich® Co., Dorset, Inglaterra) o 0.5 mg L<sup>-1</sup> de tidiazurón (TDZ; PhytoTech Labs®, Kansas, EE. UU.) más 2 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA; Sigma-Aldrich® Co., Misuri, EE. UU.). El pH se ajustó a 5.7 con HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N, antes de añadir 8 g L<sup>-1</sup> de agar y, posteriormente, los frascos se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 15 PSI durante 20 min. El TDZ se agregó después de la esterilización ya que es un compuesto termolábil. Se inocularon diez frascos por tratamiento con tres o cuatro explantes de tallo u hoja por frasco, en condiciones asépticas, y se mantuvieron a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 h. Los callos del mejor tratamiento fueron subcultivados en medio fresco con la misma composición cada 21 días y se realizaron dos lotes más para la inducción de callo en medio MS con el mejor tratamiento para dar un total de 35 frascos con tallo y 35 frascos con hoja de los tres lotes. Se obtuvo además el porcentaje y tiempo de inducción (Macías Martínez, 2017; Robledo Paz et al., 2006).

### 5.3. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de *P. sacharosa*

La cinética de crecimiento se llevó a cabo durante 40 días, partiendo de un inóculo inicial de 1 g de callo. Se realizó la medición de peso fresco y peso seco de la biomasa cada 3 días y se tomaron, al azar, 3 repeticiones por medición. La biomasa en seco se obtuvo dejando secar el tejido calloso en una estufa (Gallenkamp, Cambridgeshire, Inglaterra) a 40 °C durante 48 h.

Se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ , días<sup>-1</sup>), calculada mediante la fórmula  $\mu = \frac{\ln(X_F/X_0)}{\Delta t}$ , donde  $\Delta t$  es el intervalo de tiempo de cultivo y  $X_0$  y  $X_F$  son el peso de la biomasa en seco inicial y final de la fase exponencial, respectivamente; tiempo de duplicación ( $t_d$ , días), calculado con la fórmula  $t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$ ; e índice de crecimiento (IC) calculado con la fórmula  $IC = \frac{X_F - X_0}{X_0}$ . Se utilizó el programa GraphPad Prisma 9 para MacOS (Versión 9.5.1 [528]).

Además, se obtuvieron imágenes en un estereoscopio Leica EZ4D (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemania) de los explantes iniciales, explantes con callo y callo durante los días que se llevó a cabo su cinética de crecimiento.

### 5.4. Elaboración de extractos de hojas de la planta aclimatada y de tejido calloso

Las hojas sanas de una planta *ex vitro* del jardín de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) se recolectaron cada 15 días antes de las 9 a.m. durante 8 meses (abril-diciembre 2022). Por otro lado, tejido calloso de *P. sacharosa* cultivado *in vitro* se recolectó en el día 30 de su crecimiento. Posteriormente, todo el material vegetal se secó a 40 °C en estufa (Gallenkamp, Cambridgeshire, Inglaterra) y se pulverizó con un mortero.

Para realizar los extractos, el material seco y pulverizado obtenido previamente en el laboratorio, se dejó macerar en distintos solventes en gradiente de polaridad: hexano (JT Baker®, EE. UU.), cloroformo (JT Baker®, EE.UU.), etanol (JT Baker®, EE.UU.) y metanol (JT Baker®, EE.UU.); durante 24 h cada uno, en agitación y en condiciones de oscuridad para después ser filtrado con un papel filtro grado cualitativo (Ahlstrom grado 54, Pensilvania, EE.UU.). El sobrenadante se concentró en un rotavapor (modelo D-402-10; Sev-Prendo, Puebla, México) a 40 °C y se dejó secar hasta obtener un extracto seco para cada solvente. Los extractos se mantuvieron en refrigeración y en condiciones de oscuridad hasta su uso.

### 5.5. Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* mediante cromatografía en columna abierta y análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF)

La separación de compuestos del extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta (altura: 50 cm, diámetro: 4.5 cm y volumen: 500 mL) con 60 g de sílica gel 60 (0.40-0.063 mm, 230-400 mesh, Merck, Massachusetts, EE. UU.) como fase estacionaria, el cual se preparó en 200 mL de cloroformo y se vertió en la columna cromatográfica. Se dejó que la sílica gel se asentara uniformemente, sin burbujas, y se dejó que el nivel de solvente descendiera hasta 0.5 cm aproximadamente por encima de la superficie del gel. Se introdujeron 1.5 g del extracto etanólico de *P. sacharosa* en la columna y se colocó una torunda de algodón por encima de éste para separarlo del solvente. La columna se llenó hasta 500 mL de solvente. La elución se llevó a cabo en gradiente de concentración utilizando como fase móvil mezclas de cloroformo: metanol (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 0:100). Se tomaron fracciones con volúmenes de 25 mL y éstas se concentraron en un rotavapor al vacío a 40 °C.

Las fracciones se fueron analizando mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como fase móvil la misma composición de solventes con la que fueron recuperados en la columna hasta que fuera necesario cambiar el solvente. Estas cromatografías se realizaron en placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemania). Las placas se revelaron bajo una lámpara de luz ultravioleta (Luz UV, Spectronics Co., Nueva York, EE.UU.) a 254 nm y 365 nm para revelar compuestos fenólicos diversos (Tabla 1). Posteriormente, se utilizó el reactivo NP/PEG para revelar flavonoides, el cual consiste en una solución de 2-aminoetildifenilborinato (NP, Sigma-Aldrich® Co., Múnich, Alemania) al 1% en metanol con polietilenglicol (PEG, Sigma-Aldrich® Co., Misuri, EE. UU.) al 1%; una vez rociado en la placa cromatográfica, se observa a luz UV a 365 nm (Tabla 1). Además, se utilizó el reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico (AS) para revelar saponinas y terpenos o reactivo Liebermann-Burchard (LB) para revelar triterpenos y esteroides. AS consiste en una solución de anisaldehído (Sigma-Aldrich® Co., Misuri, EE.UU.) al 0.5%, ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, JT Baker®, México) al 5% y ácido acético glacial (JT Baker®, EE.UU.) al 10% en metanol; mientras que LB consiste en una solución de anhídrido acético (JT Baker®, México) al 10% con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en etanol. Las placas reveladas con AS y LB se calentaron en una parrilla hasta observar los colores de los compuestos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para revelar grupos de compuestos.

<b>Revelador</b>	<b>Compuestos</b>
<b>Luz UV 254 nm</b>	Compuestos con dobles enlaces conjugados como cumarinas, antraglicósidos y fenoles
<b>Luz UV 365 nm</b>	Compuestos fluorescentes: -Rojo: cumarinas -Azul: ácidos fenol carboxílicos
<b>Reactivo NP/PEG</b>	Flavonoides
<b>Reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico (AS)</b>	Azul-violeta: saponinas y terpenos
<b>Reactivo de Lieberman-Burchard (LB)</b>	-Rojo-violeta: triterpenos -Azul-verde: saponinas esteroidales

Finalmente, las fracciones se reunieron según su similitud en el factor de retención ( $R_f$ , por sus siglas en inglés) y en los compuestos revelados dando un total de 26 fracciones, las cuales fueron concentradas y se llevaron a sequedad. Todas las fracciones se analizaron nuevamente mediante CCF con las siguientes fases móviles: cloroformo:metanol (100:0) para las fracciones F1 a F3; cloroformo:metanol (98:2) para F3-F6; cloroformo:metanol (90:10) para F6-F14 más un estándar de camferol (Sigma-Aldrich® Co., Múnich, Alemania) y un control interno; y una CCF en fase reversa con agua:acetonitrilo (60:40) para F13-F26 más estándares de camferol-3-O- $\beta$ -rutinosido (Sigma-Aldrich® Co., St. Quentin Fallavier, Francia), ligustroflavona (Phytolab GmbH & Co., Vestenbergsgreuth, Alemania) y vitexina (Sigma-Aldrich® Co., Múnich, Alemania). Se calcularon los  $R_f$  de los estándares utilizados, así como de los compuestos más representativos de las fracciones, mediante la fórmula  $R_f = \frac{D_s}{D_f}$ , donde,  $R_f$  es el factor de retención,  $D_s$  es la distancia recorrida por el analito o banda visualizada y  $D_f$  es la distancia recorrida por la fase móvil, por lo que el valor de un  $R_f$  se encuentra entre 0 y 1.

Una vez realizado este análisis, se seleccionó la fracción 10 (F10) para los bioensayos destinados al análisis de la actividad antiinflamatoria.

### **5.6. Análisis de posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas, de callos y F10 de *P. sacharosa* mediante CCF**

Los extractos etanólicos secos de hojas y de callos de *P. sacharosa*, así como F10, se analizaron mediante CCF para observar la similitud de compuestos entre ellos. Se realizaron dos CCF: la primera se realizó en fase normal con cloroformo:metanol (90:10) como fase móvil; se compararon

los extractos y F10 con un control interno y con un estándar de camferol; las placas fueron reveladas con luz UV 254 y 365 nm, NP/PEG, AS y LB. La segunda CCF se realizó en fase reversa con agua:acetonitrilo (60:40) como fase móvil; se compararon los extractos con estándares de ligustroflavona, camferol-3-O- $\beta$ -rutinosido y vitexina; las placas fueron reveladas con luz UV 254 y 365 nm y NP/PEG.

## **5.7. Análisis del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y fracciones de *P. sacharosa* en ratones adultos de las cepas CD1 y C57BL/6JN, sometidos a neuroinflamación con LPS**

### **5.7.1. Animales**

Se utilizaron 12 ratas Wistar macho adultas de 8 semanas de edad con un peso de 270-320 g del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) y 75 ratones adultos macho cepas CD1 y C57BL/6JN de 8 semanas de edad con un peso de 28-30 g. Los animales fueron aclimatados a condiciones ambientales estándar (luces encendidas entre las 0700 y las 1900 horas, temperatura 22 °C  $\pm$  1 °C, comida y agua *ad libitum*). Los protocolos siguieron la guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (8ª ed.), y la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999. Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el INPRFM.

Todos los tratamientos se administraron vía intraperitoneal (ip). Las dosis de LPS (Sigma O127: B8; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para ratones y ratas fueron de 150  $\mu$ g/kg de peso corporal y 250  $\mu$ g/kg de peso corporal, respectivamente; mientras que la dosis de F10 fue de 30 mg/kg de peso corporal para ambas especies. Tanto las dosis de LPS como de F10, se disolvieron en 100  $\mu$ L de vehículo por cada ratón y 250  $\mu$ L por cada rata. El vehículo consistió en solución salina isotónica (SSI) + Tween 80.

### **5.7.2. Fluorescencia de F10 al microscopio y su presencia en el cerebro de ratón**

En un portaobjetos para microscopio de fluorescencia, se colocó una gota de: Tween 80, SSI, F10 disuelta en el vehículo y almacenada durante 8 semanas a temperatura ambiente, F10 disuelta en el vehículo y almacenada durante 1 semana a 4 °C, y F10 recién disuelta en el vehículo. Todas las muestras se observaron en 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 425 nm; 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 usando una cámara digital Firewire (DFC450C, Leica) y el software Leica Application Suite.

Para evaluar la presencia de F10 en el cerebro de ratón, un grupo de ratones (n= 5) se dividieron en dos grupos: grupo vehículo (n= 1) al que se le administró vehículo sin F10 y grupo F10 (n= 3) al que se le administró F10. El LPS fue administrado 60 min después. Después de 3 h de monitoreo, los ratones se anestesiaron profundamente con pentobarbital (50 mg/kg de peso corporal ip) y se les realizó una perfusión cardiaca con 20 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS 1x, pH 7.4)-heparina, seguido de 150 ml de paraformaldehído al 4%-PBS 1x (pH 7.4). Una vez terminada la perfusión, se extrajeron los cerebros de los animales y se sumergieron en paraformaldehído al 4% durante 12 h y posteriormente se colocaron en sacarosa al 25% durante 72 h para después congelarlos en hielo seco y almacenarlos a -80 °C hasta su uso.

Cada cerebro fue cortado en secciones de 25 µm en un criostato (Leica CM3050 S, Nussloch GmbH, Alemania) a nivel de la eminencia media (Bregma: -0.22). Se colectaron 6 cortes en un portaobjetos de microscopio Superfrost/Plus (Thermo Fisher Scientific; Cat. n.º 12-550-15) y se observaron en un microscopio de fluorescencia con los mismos objetivos y filtros, así como la captura de las imágenes.

### ***5.7.3. Actividad cerebral en ratas con LPS mediante electroencefalografía (EEG)***

Las ratas fueron sometidas a una cirugía estereotáxica. Para ello, se anestesiaron con cloruro de ketamina (50 mg/kg de peso corporal) y cloruro de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) ip y se colocaron en un aparato estereotáxico con bregma y lambda en el plano horizontal. Posteriormente, se les implantó un electrodo monopolar tanto en el lado izquierdo del hipotálamo, como en el derecho, a las siguientes coordenadas estereotáxicas del bregma: AP: -3.6 mm, DV: 3.0 mm y L: 2.4 mm. Para ello, se realizó una incisión en la piel que recubría el cráneo para exponerlo y determinar las posiciones de los electrodos; se taladraron dos orificios de 1 mm y se implantaron los electrodos de acero inoxidable; además se conectó otro electrodo como tierra en el hueso parietal. Los electrodos se fijaron al cráneo con acrílico dental.

El periodo de recuperación postquirúrgico de las ratas fue de 1 semana. Una vez transcurrido el tiempo, los animales fueron asignados a dos grupos experimentales: grupo control (n= 6) quienes recibieron LPS y el grupo experimental (n= 6) quienes recibieron F10 y 30 min después recibieron una dosis de LPS.

La actividad electrográfica del hipocampo se registró utilizando un amplificador modelo P511 (Grass, MA, EE. UU.). El registro terminó 6 h después de la administración del LPS en todas las ratas. Los

análisis espectrales se examinaron utilizando el software ADQ4, el cual fue desarrollado en el INPRFM. Los análisis se realizaron por métodos de Transformada Rápida de Fourier para la línea base (antes de la administración de F10 y del LPS), 20 min después de la administración de F10 y después de la administración del LPS al minuto 0, 60, 120, 180, 240, 300 y 360.

#### **5.7.4. Análisis histológico del gen de respuesta temprana cFos y de CD14 mediante hibridación *in situ* en cortes de cerebro de ratones con LPS**

Ratones de las cepas CD1 y C57BL/6JN se dividieron en 5 grupos: grupo control (Vm, n= 13), quienes recibieron vehículo; grupo LPS 3 h (n= 13), quienes recibieron una dosis de LPS y se monitorearon durante 3 h; grupo LPS 9 h (n= 14), quienes recibieron LPS y se monitorearon por 9 h; grupo F10 + LPS 3 h (n= 19), quienes recibieron F10 60 min antes de administrar el LPS, y F10 + LPS 9 h (n= 16).

Una vez que paso el tiempo de monitoreo, los ratones se sacrificaron y su cerebro fue disecado y colocado en sacarosa al 25% durante 72 h para después congelarlos en hielo seco y almacenarlos a -80 °C hasta su uso. Cada cerebro fue cortado en secciones de 18 µm en un criostato a nivel de la eminencia media (Bregma: -0.22). Se colectaron 6 cortes en un portaobjetos de microscopio Superfrost/Plus (Thermo Fisher Scientific; Cat. n.º 12-550-15) las cuales tienen carga positiva para mantener los cortes unidos a la lámina.

Los cortes montados se fijaron con paraformaldehído al 4 %-PBS 1x (pH 7.4) durante 10 min, se enjuagaron dos veces en PBS 1x durante 5 min, se acetilaron con anhídrido acético al 0.25 % en trietanolamina 0.1 M durante 10 min, se volvieron a lavar dos veces con PBS 1x durante 5 min y después se deshidrataron con series ascendentes de etanol (80%, 95% y absoluto durante 1 min) y cloroformo (10 min), parcialmente rehidratados en etanol absoluto y al 95% durante 1 min. Las muestras después se procesaron para hibridación *in situ*.

Los cortes se hibridaron con una mezcla de hibridación que contenía: Tris-HCl 1 M pH 8.0 al 4%, solución de NaCl y citrato de sodio (SSC) 20x al 1%, 0.1 g de dextran sulfato, solución Denhardt 100x al 1%, ditiotreitól (DTT) 1M al 1%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNss) al 2.5%, formamida al 50% y dodecil sulfato sódico (SDS 10%) al 5%. Dicha mezcla se preparó para tener 80 µL por lámina con 6 cortes y se incubó a 54 °C (temperatura de hibridación) hasta su uso. Posteriormente, se agregó a la mezcla de hibridación la sonda cFos marcada con digoxigenina y la sonda CD14 marcada con fluoresceína (ambas 2.5 µL por lámina de 6 cortes). La mezcla de hibridación con las sondas se colocó en cada una de las láminas con los cortes (80 µL) y se cubrieron con parafilm. Se incubaron durante 16 h a 54 °C en una cámara humidificada con agua y formamida para evitar la evaporación del agua.

Una vez terminada la hibridación, las láminas se lavaron con SSC 1x por 15 min, posteriormente con buffer para incubar ARNasa (25 µg/mL) a 37 °C por 1 h. Se volvieron a lavar con SSC 1x por 15 min y finalmente una vez con SSC 0.5x por 15 min y tres veces con SSC 0.1x por 30 min a 65 °C.

Las láminas fueron pretratadas para el anticuerpo primario con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0.5% con Tritón x-100 en PBS 1x por 15 min, se lavaron tres veces con PBS 1x por 10 min y con buffer de ácido málico (pH 7.5) por 10 min. Se incubaron en solución bloqueadora al 1% (Roche) diluida en buffer de ácido málico para después agregar los anticuerpos. Las sondas cFos-digoxigenina (cFos-dig) y CD14-fluoresceína (CD14-F) se detectaron con anticuerpo anti-digoxigenina de oveja conjugado con peroxidasa (Roche, cat. 11207733910) y anti-fluoresceína de ratón (Roche, cat. 11426320001), ambos diluidos 1:50 en solución bloqueadora (Roche, cat. 11096176001) al 1%. Las láminas se dejaron incubando con los anticuerpos durante 48 h en cámara húmeda a 4 °C.

Posteriormente, las láminas se lavaron 10 veces por 5 min cada vez en TNT (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M y 0.05% Tween 20). Una vez transcurridos los lavados, se incubó con biotina-tiramida (TSA Plus Biotin Kit, Perkin Elmer, cat. NEL749A001KT) 1:50, diluida en una solución de Tris 1 M pH 7.5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:10, para después volver a realizar 10 lavados de 5 min con TNT. Se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, los anticuerpos secundarios Alexa 488-streptavidina (Invitrogen, cat. S32354), 1:1000 en reactivo de bloqueo al 1%, para amplificar la señal de la peroxidasa unida a al anticuerpo anti-digoxigenina, a la par con un anticuerpo policlonal anti-ratón Cy3 (Jackson, cat. AB\_2340813) 1:100 para revelar la anti-fluoresceína. Este proceso se realiza en condiciones de oscuridad. Los anticuerpos se lavaron 10 veces por 5 min con TNT y finalmente, dos veces por 10 min en Tris 0.05 M pH 7.5.

Finalmente, se les colocó medio de montaje con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vectashield, Vector Laboratories) y se sellaron con un cubreobjetos para observarse al microscopio de fluorescencia con los mismos objetivos y filtros, así como la captura de las imágenes. Los núcleos celulares se observan con el filtro para DAPI (azul), mientras que cFos con el filtro verde y CD14 con el filtro rojo.

Los resultados se presentan como la media del número de células positivas a cFos, CD14 y cFos + CD14 en los cinco grupos ± el error estándar. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados se consideraron significativos cuando los valores de p fueron menores a 0.05 (p < 0.05). El software utilizado fue GraphPad Prisma 9 para MacOS (Versión 9.5.1 [528]), con ayuda de Microsoft Excel.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Propagación *in vitro* de *P. sacharosa*

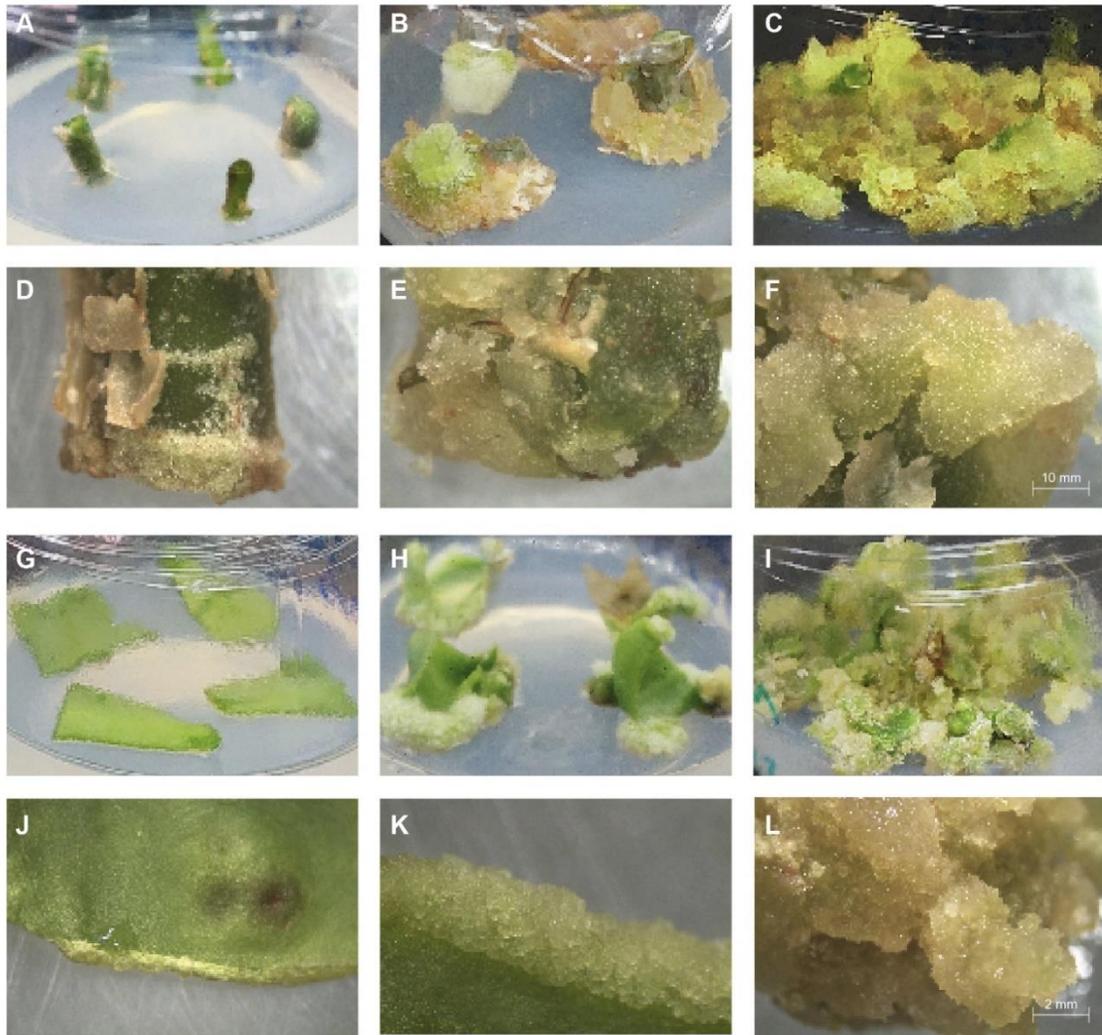
Las plantas propagadas *in vitro* de *P. sacharosa* tuvieron una media de 10 (6-20) hojas por plántula y crecieron en promedio 8 (4-13) cm. En la Figura 4, se muestra una plántula a tres meses de haberse cultivado.



**Figura 4.** Planta de *P. sacharosa* propagada *in vitro*.

### 6.2. Inducción y establecimiento de cultivos *in vitro* de tejido calloso

La inducción de tejido calloso se dio con el tratamiento que llevaba TDZ y ANA como RCV, dando como resultado callos friables. La inducción comenzó a los 10 días con un porcentaje de inducción del 100%. El tejido calloso a partir del tallo de *P. sacharosa* se obtuvo en mayor cantidad y con mayor friabilidad que el de la hoja. Los callos se recolectaron después de 40 días. En la Figura 5, se muestran las etapas de inducción del tejido calloso tanto en tallo como en hoja.



**Figura 5.** Etapas de la inducción de tejido calloso. Fotografías tomadas en microscopio (B-C; H-I) y su acercamiento en estereoscopio (D-F; J-L). A) y D) Explante inicial de tallo. B) y E) Tallo más tejido calloso a los 20 días de inducción. C) y F) Tejido calloso del tallo recolectado a los 40 días de inducción. G) y J) Explante inicial de hoja. H) y K) Hoja más tejido calloso a los 20 días de inducción. I) y L) Tejido calloso de la hoja recolectado a los 40 días de inducción.

### 6.3. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de *P. sacharosa*

En la Figura 6, se observa la cinética de crecimiento del tejido calloso proveniente del tallo de *P. sacharosa*. La cinética comprende una fase de latencia o adaptación (lag) al medio del día 1 al 7, una fase de crecimiento exponencial (del día 9 al 23), una fase estacionaria (del día 26 al 40) en la que no hay crecimiento.

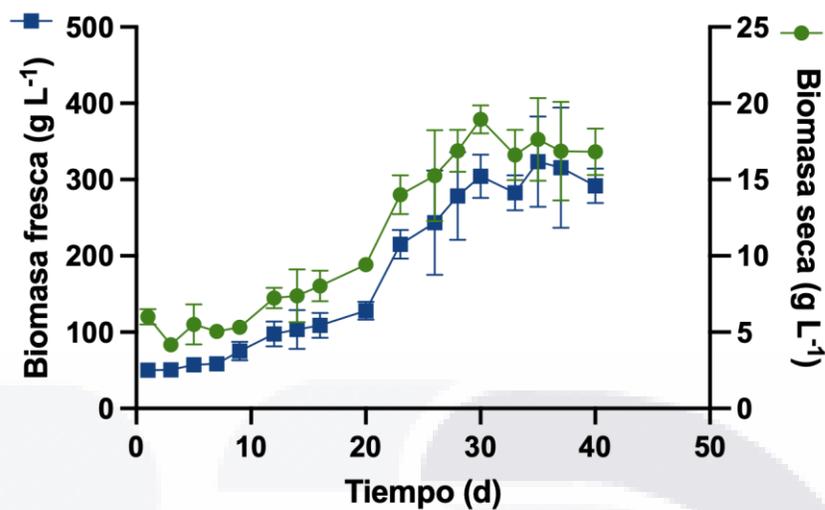


Figura 6. Cinética de crecimiento del tejido calloso de *P. sacharosa*.

Se comenzó con una biomasa seca inicial de 6 g L<sup>-1</sup> y se terminó con una biomasa seca final de 17 g L<sup>-1</sup>. La fase exponencial se utilizó para la determinación de los parámetros cinéticos y se realizó con la biomasa seca. El tiempo en el cual se alcanzó la biomasa máxima fueron 30 días. La velocidad específica de crecimiento fue de  $\mu = 0.07 \text{ d}^{-1}$ . El tiempo de duplicación fue de  $t_d = 10 \text{ d}$ . El índice de crecimiento fue de  $IC = 3.03$ . En la Figura 7, se muestra el crecimiento en biomasa fresca del tejido calloso en los días 1, 10, 20 y 30.

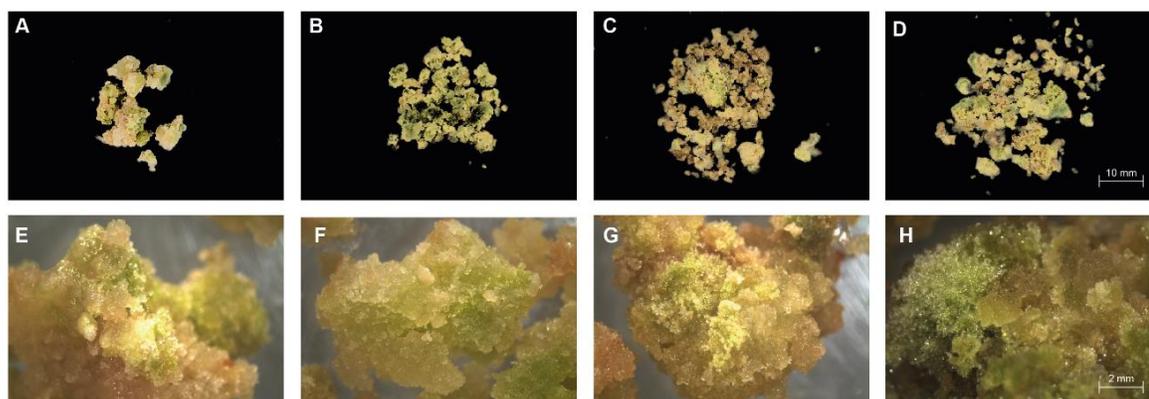


Figura 7. Crecimiento del tejido calloso con respecto al tiempo y su acercamiento en estereoscopio: A) y E) día 1; B) y F) día 10; C) y G) día 20; D) y H) día 30.

#### 6.4. Elaboración de extractos de hojas de la planta aclimatada y de tejido calloso

Las hojas de *P. sacharosa* creciendo a la intemperie tuvieron un peso de 112.54 g de biomasa seca, mientras que del tejido calloso se obtuvieron 24.4 g de biomasa seca con un 92.68% de humedad.

A partir de la biomasa seca, tanto de hojas como callos, se obtuvieron extractos con hexano, cloroformo, etanol y metanol como solventes. Los rendimientos de los extractos de hoja de la planta a la intemperie se encuentran en la Tabla 2, en donde se observa que el extracto metanólico presenta un mayor rendimiento, seguido del extracto etanólico, clorofórmico y hexánico.

**Tabla 2.** Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de hojas de *P. sacharosa* a la intemperie.

Solvente	Peso biomasa seca (g)	Peso extracto (mg)	Rendimiento (mg extracto/g biomasa seca)
Hexano	112.54	73.4	0.6522
Cloroformo	112.54	109.1	0.9694
Etanol	112.54	230.2	2.0455
Metanol	112.54	333.0	2.9589

Con respecto a los extractos del tejido calloso, se observó la misma tendencia en rendimientos con respecto a los solventes utilizados (Tabla 3).

**Tabla 3.** Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de tejido calloso de *P. sacharosa*.

Solvente	Peso biomasa seca (g)	Peso extracto (mg)	Rendimiento (mg extracto/g biomasa seca)
Hexano	24.4	129.4	5.3033
Cloroformo	24.4	173.3	7.1025
Etanol	24.4	440.6	18.0574
Metanol	24.4	477.3	19.5615

#### 6.5. Fraccionamiento del extracto etanólico de *P. sacharosa* mediante cromatografía en columna abierta y análisis mediante CCF

Se obtuvieron un total de 130 fracciones por todos los sistemas de elución utilizados. Estas fracciones se reunieron según su similitud dada por sus  $R_f$  y los compuestos encontrados en las CCF. Finalmente, se obtuvieron 26 fracciones ya reunidas (Tabla 4).

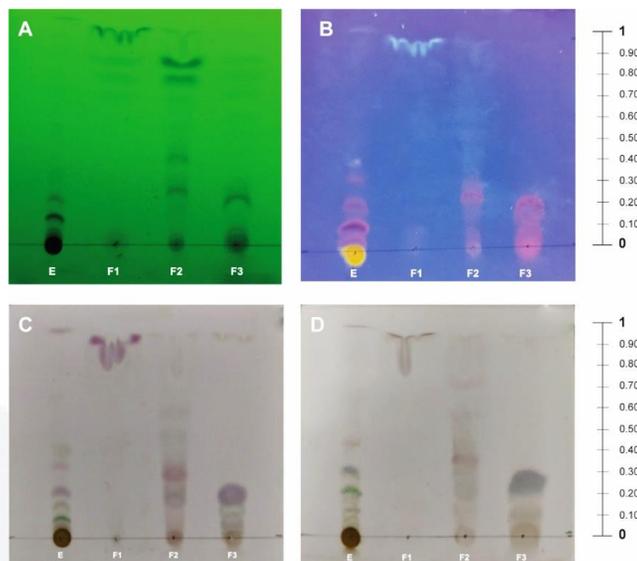
**Tabla 4.** Fraccionamiento del extracto etanólico de *P. sacharosa*.

Sistema de elución	Fracción	Fracciones reunidas	Clave
Cloroformo 100%	1-10	1	F1
Cloroformo:metanol 95-5%	11-28	2-3	F2
Cloroformo:metanol 90-10%	29-47	4-5	F3
Cloroformo:metanol 85-15%	48-67	6-7	F4
Cloroformo:metanol 80-20%	68-83	8	F5
Cloroformo:metanol 70-30%	84-95	9-15	F6
Cloroformo:metanol 60-40%	97-110	16-17	F7
Cloroformo:metanol 50-50%	111-119	18-25	F8
Metanol 100%	120-130	26-27	F9
		28-33	F10
		34-43	F11
		44-48	F12
		49-51	F13
		52-60	F14
		61	F15
		62-65	F16
		66-67	F17
		68-70	F18
		71-76	F19
		77-89	F20
		90-95	F21
		97-99	F22
		100-111	F23
		112-116	F24
		117-124	F25
		125-130	F26

La fracción F10 obtenida con la fase móvil cloroformo: metanol 90:10, fue utilizada para el análisis del efecto antiinflamatorio, una vez que se analizaron los compuestos presentes mediante CCF.

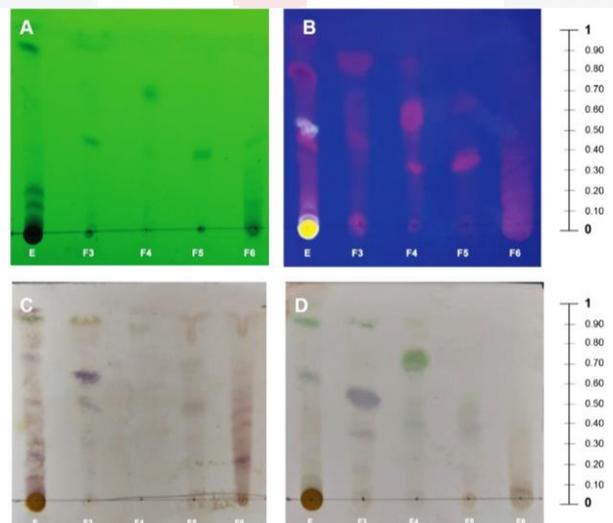
En general, se encontró una gran variedad de compuestos en todas las fracciones obtenidas que van desde cumarinas y compuestos fenólicos como los flavonoides, hasta terpenos, esteroides y saponinas. En las Figuras 8 a 11, se muestran las CCF, con los distintos reveladores, de las 26 fracciones obtenidas.

En F2 y F3 se encontraron bandas de cumarinas reveladas bajo NP/PEG más UV 365 nm, con un Rf de 0.24 para F2 y de 0.2 para F3 (Figura 8B). También se encontraron bandas para saponinas y terpenos bajo el revelador AS, con Rf de 0.18 y 0.3 para F2, y Rf de 0.06, 0.14 y 0.2 para F3 (Figura 8C). Bajo el revelador LB, se encontró una banda para un compuesto de tipo terpenoide con Rf de 0.26 en F3 (Figura 8D).



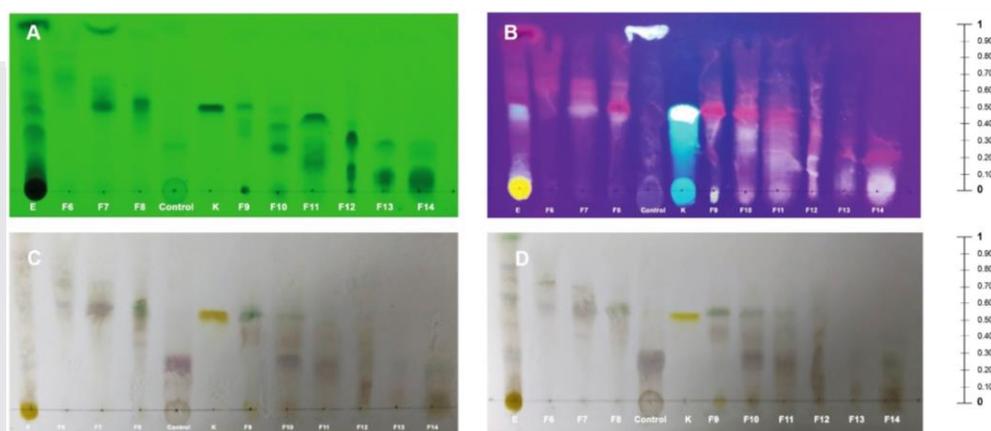
**Figura 8.** Separación por CCF de F1 a F3 en fase normal con cloroformo:metanol (100:0) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB.

En F4 a F6 se encontraron varias bandas que revelan para cumarinas, bajo NP/PEG (Figura 9B). Sin embargo, a esta fase móvil, F3 también muestra una banda de tipo saponinas o terpenos bajo el revelador AS, con  $R_f$  de 0.64 (Figura 9C); mientras que con el revelador LB se observa una banda violeta ( $R_f$  de 0.5), características de terpenos (Figura 9D). F4 mostró una banda verde bajo el revelador LB, característico de saponinas esteroidales, con  $R_f$  de 0.7 (Figura 9D).



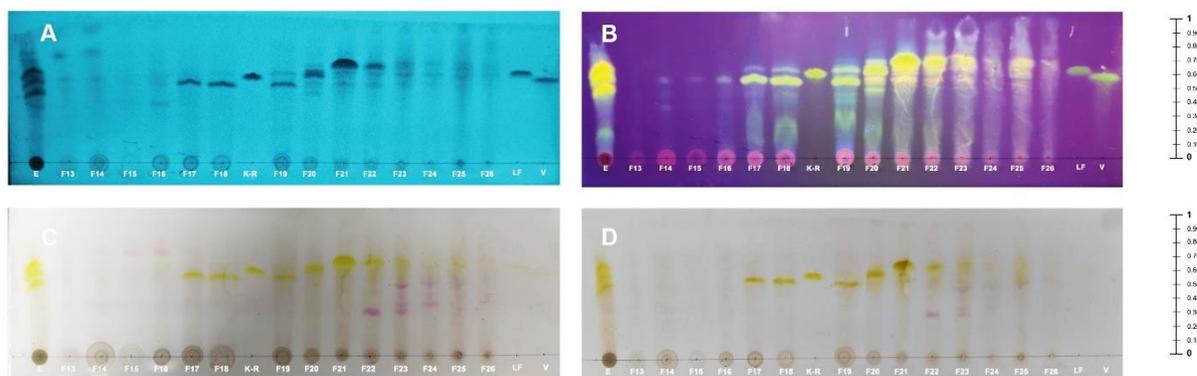
**Figura 9.** Separación por CCF de F3 a F6 en fase normal con cloroformo:metanol (98:2) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB.

En F6 a F14 se encontró una gran variedad de compuestos como fenoles, cumarinas, flavonoides, terpenos y saponinas esteroidales (Figura 10). El estándar de camferol presentó un Rf de 0.48, el cual puede estar presente en F10, pero opacado por otros compuestos como cumarinas, la cual presentó el mismo Rf (Figura 10A y 10B). No obstante, F10 también reveló bandas para saponinas, terpenos y esteroides bajo AS y LB, con una banda violeta con Rf de 0.26, una banda café-verde con Rf de 0.4 y una banda verde con Rf de 0.54, las tres para ambos reveladores (Figura 10C y 10D).



**Figura 10.** Separación por CCF de F6 a F14 más un control interno y un estándar de camferol (K), en fase normal con cloroformo:metanol (90:10) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB.

De F13 a F26, se corrieron en fase reversa, debido a que existen también compuestos de tipo polar, tal es el caso de los flavonoides que se observaron con bandas oscurecidas bajo UV 254 nm (Figura 11A) y que se revelaron con NP/PEG (Figura 11B). El estándar de camferol-3-O-β-rutinósido presentó un Rf de 0.61, y este puede estar presente en las fracciones F20, F21, F22 y F25. Por otro lado, el estándar de ligustroflavona tuvo un Rf de 0.62, flavonoide que podría encontrarse en las fracciones F19 a F25. Finalmente, el estándar de vitexina tuvo un Rf de 0.58 y se encontraron bandas con este Rf en las fracciones F14 a F20 (Figura 11B). No obstante, también se encontraron compuestos de tipo saponinas y terpenos con el revelador AS, por ejemplo, F15 y F16 mostraron bandas violetas con Rf de 0.73 (Figura 11C). Las fracciones F22, F23 y F24 también mostraron bandas de color violeta, tanto para AS como para LB, lo que indica la posible presencia de terpenos (Rf de 0.30 para F22-F23, y de 0.36, 0.42 y 0.48 para F23-F24) (Figura 11C y 11D).

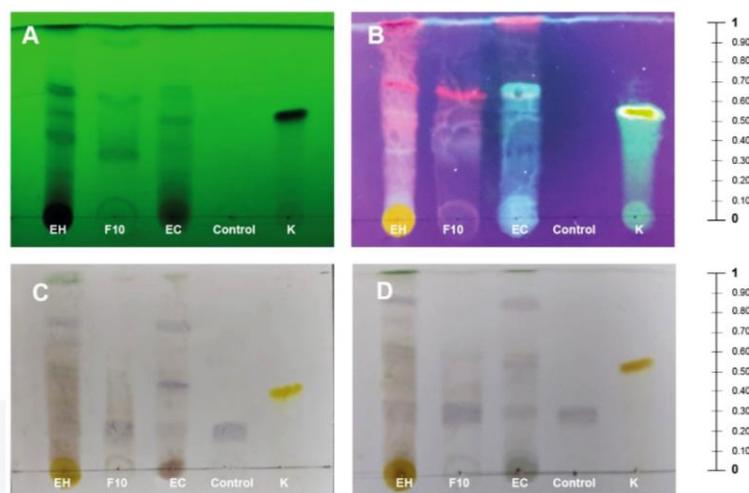


**Figura 11.** Separación por CCF de F13 a F26, más estándares de camferol-3-O- $\beta$ -rutinosido (K-R), ligustroflavona (LF) y vitexina (V), en fase reversa con agua:acetonitrilo (60:40) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB.

### 6.6. Análisis de posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas, de callos y F10 de *P. sacharosa* mediante CCF

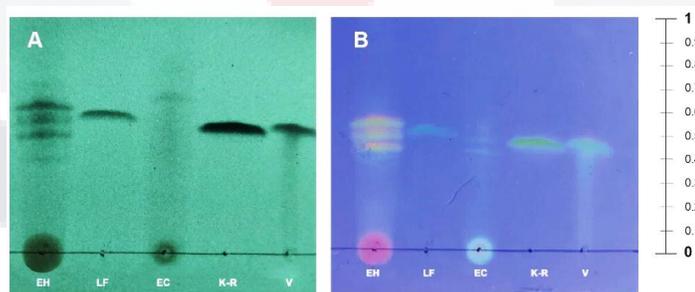
Las CCF de los extractos etanólicos de hojas y de callos de *P. sacharosa* y F10 mostraron similitud de compuestos principalmente de terpenos y esteroides revelados con AS y LB en la CCF en fase normal, así como de flavonoides revelados con NP/PEG mediante la CCF en fase reversa.

En la Figura 12, se observa la CCF en fase normal, donde la banda del camferol no se observa en el extracto de tejido calloso; sin embargo, se observa una banda azul (Rf de 0.65), característica de ácidos fenólicos, así como una banda rosa característica de cumarinas (Rf de 0.62) tanto para F10 como para el extracto de los callos (Figura 12B). Por otro lado, se observan bandas de color violeta reveladas con AS y LB en F10 y el extracto de los callos, con un Rf de 0.19 para AS y de 0.29 para LB, así como otras dos bandas violetas en el extracto de los callos con Rf de 0.43 y 0.73 para AS y de 0.55 y 0.85 para LB (Figura 12C y 12D). La diferencia en los Rf de estos compuestos puede verse afectada por ligeros cambios en la fase móvil debido a la volatilidad del cloroformo.



**Figura 12.** Separación por CCF del extracto etanólico de hojas (EH), extracto etanólico de callos (EC) y F10 de *P. sacharosa*, más un control interno y un estándar de camferol (K), en fase normal con cloroformo:metanol (90:10) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm; C) reactivo AS; D) reactivo LB.

Finalmente, la CCF en fase reversa mostró la posible presencia de los estándares de ligustroflavona (Rf de 0.52), camferol-3-O-β-rutinósido (Rf de 0.47) y vitexina (Rf de 0.45) en el extracto de los callos (Figura 12). Todos los compuestos mencionados también estuvieron presentes en el extracto de las hojas, incluyendo los analizados en la Figura 12.

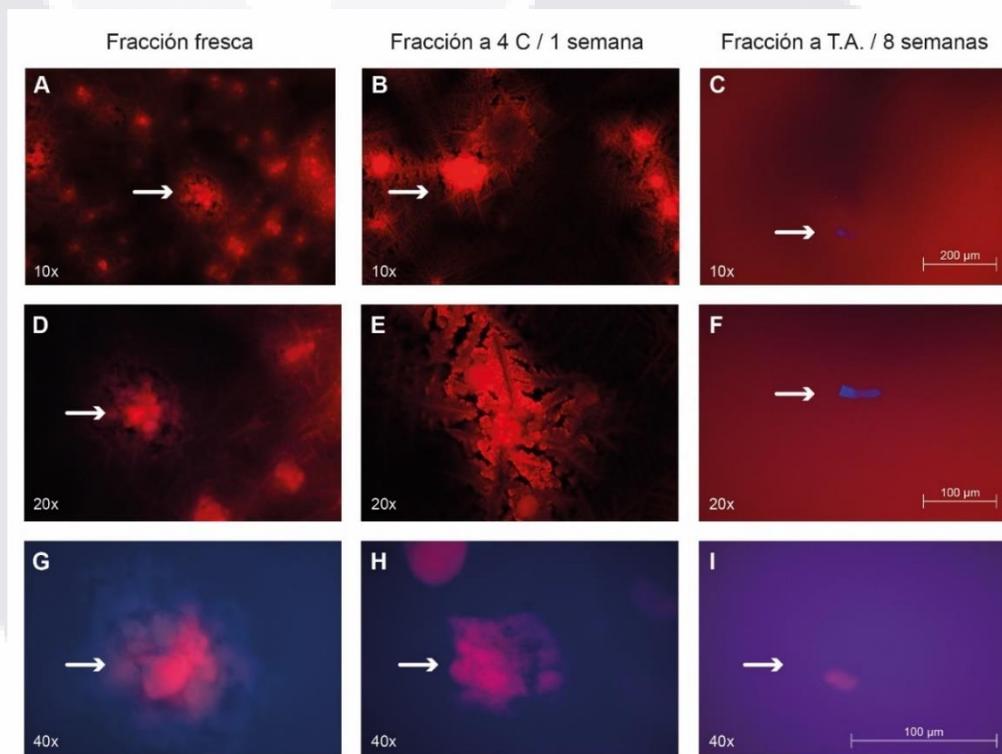


**Figura 13.** Separación por CCF del extracto etanólico de hojas (EH) y del extracto etanólico de callos (EC) de *P. sacharosa*, más estándares de ligustroflavona (LF), camferol-3-O-β-rutinósido (K-R) y vitexina (V), en fase reversa con agua:acetonitrilo (60:40) como fase móvil, reveladas con: A) luz UV 254 nm; B) reactivo NP/PEG más luz UV 365 nm.

**6.7. Análisis del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y fracciones de *P. sacharosa* en ratones adultos de las cepas CD1 y C57BL/6JN, sometidos a neuroinflamación con LPS**

**6.7.1. Fluorescencia de F10 y su presencia en el cerebro de ratón**

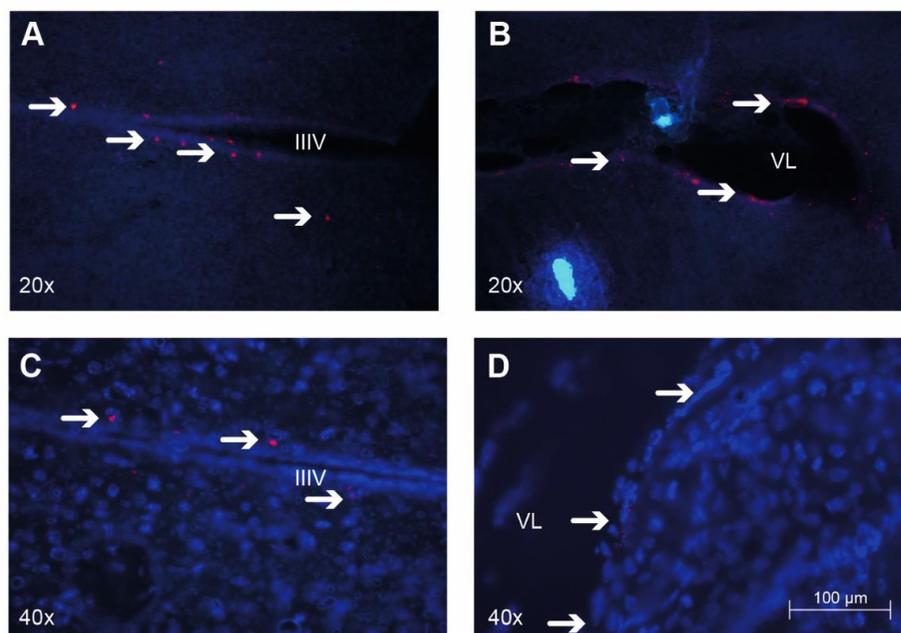
F10 presentó fluorescencia en los tres filtros del microscopio, siendo más evidente en el filtro para DAPI (Figura 14). Se corroboró que el Tween 80 y la SSI no presentaban fluorescencia. Por otro lado, F10 presentó disminución de la fluorescencia con respecto al tiempo y sus condiciones de almacenamiento; a 1 semana almacenada a 4 °C aún se conservó la fluorescencia, sin embargo, a 8 semanas almacenada a temperatura ambiente se perdió la fluorescencia (Figura 14).



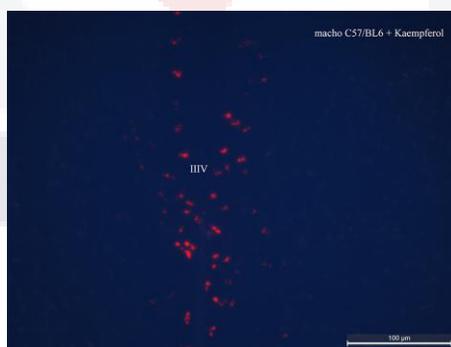
**Figura 14.** F10 observada al microscopio de fluorescencia con el filtro para DAPI. A) F10 recién preparada y conservada a 4 °C. B) F10 almacenada durante 1 semana a 4 °C. C) F10 mantenida durante 8 semanas a temperatura ambiente (T.A.). Las flechas en A, D, G), B, E, H) o C,F,I) muestran fragmentos de F10 observados con el microscopio de fluorescencia a una emisión de 460 nm a diferentes ampliaciones.

Se observó una sección cortada del cerebro de ratón al microscopio y se corroboró la presencia de F10 en los ventrículos del cerebro. Esto se observó claramente en el filtro para DAPI, en donde se tiñeron de azul con medio de montaje, los núcleos de las neuronas en el cerebro, mientras que F10 conserva un color rojo (Figura 15). Esta señal se comparó con la señal de un estándar de camferol

reportada por Ruiz-Velasco-Martínez et al. (2022), el cual también presenta una coloración roja como se puede observar en la Figura 16.

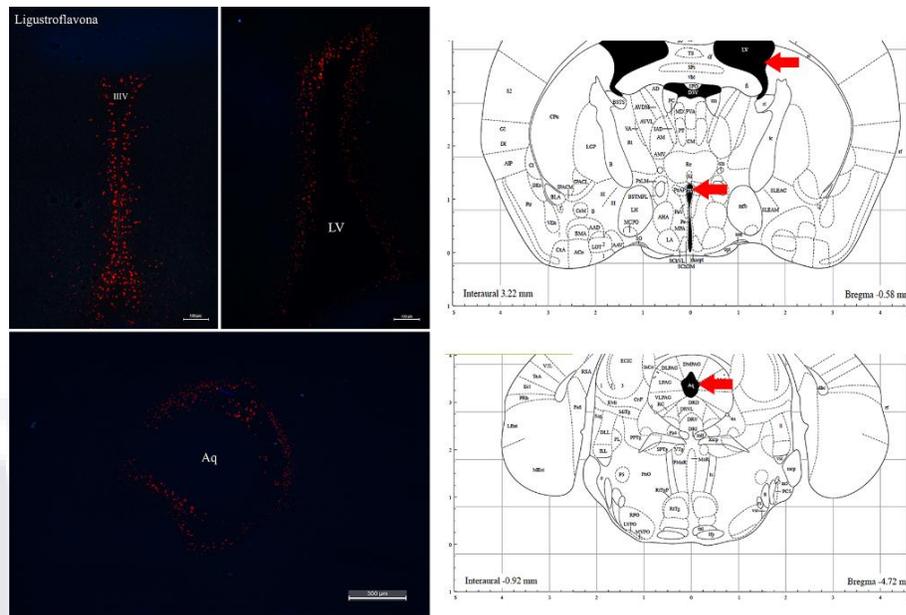


**Figura 15.** Presencia de F10 en cortes de cerebro del ratón. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI y observados al microscopio de fluorescencia con un filtro que emite a 460 nm (color azul). A esta longitud de onda F10 se observa en color fucsia (flechas). A, D) tercer ventrículo, B, E) ventrículo lateral

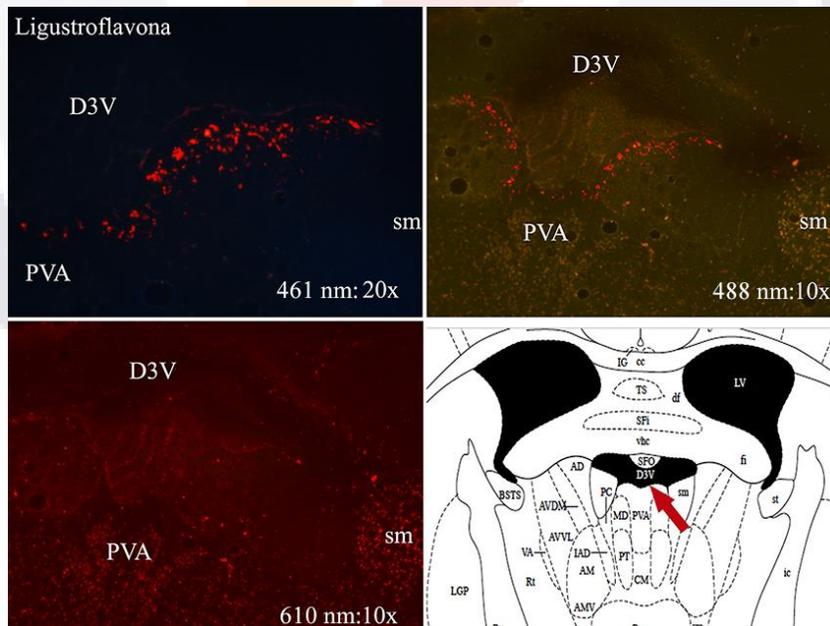


**Figura 16.** Presencia de camferol en el tercer ventrículo cerebral de ratones. *Modificada de: Ruiz-Velasco-Martínez et al. (2022)*

Además, se administró un estándar de ligustroflavona, el cual pudo observarse también en el tercer ventrículo y los ventrículos laterales, así como en el acueducto cerebral, el núcleo paraventricular del tálamo y la estría medular del tálamo (Figuras 17 y 18).



**Figura 17.** Presencia de ligustroflavona en el cerebro de ratón. A) Tercer ventrículo, B) ventrículo lateral, C) acueducto cerebral, D) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde las flechas rojas muestran la localización de los ventrículos cerebrales, E) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde las flechas rojas muestran la localización del acueducto cerebral.



**Figura 18.** Presencia de ligustroflavona en el cerebro de ratón. A) con filtro para DAPI en azul, B) con filtro verde, C) con filtro rojo, D) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde la flecha roja muestra la localización de los ventrículos cerebrales, E) corte rostro-caudal del cerebro de ratón, donde las flechas rojas muestran la localización del tercer ventrículo dorsal. D3V: tercer ventrículo dorsal. PVA: núcleo paraventricular del tálamo, parte anterior. sm: estría medular, tálamo.

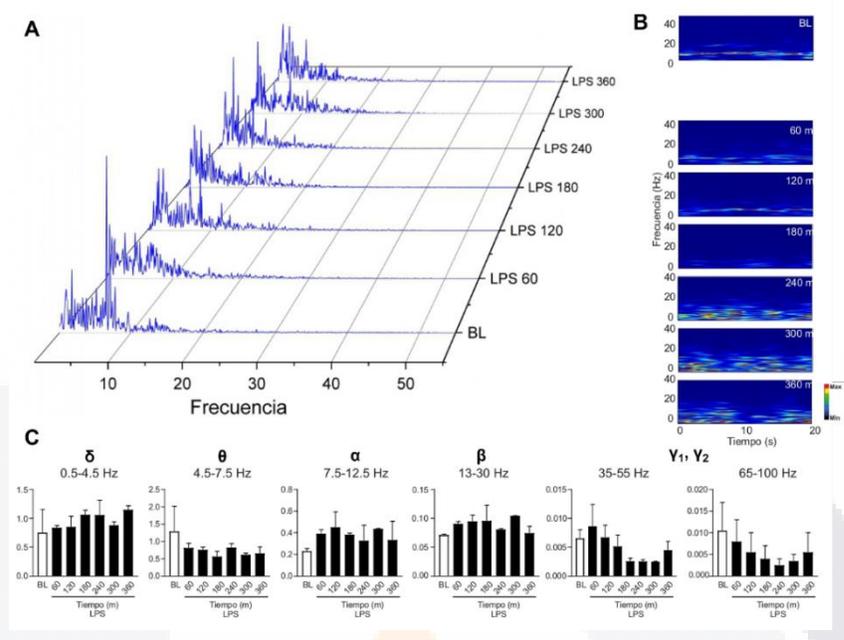
### **6.7.2. Actividad cerebral en ratas con LPS mediante EEG**

En la EEG, se pueden observar distintos tipos de ondas que dependen de la frecuencia a la que se encuentren. Las ondas de baja frecuencia son delta ( $\delta$ , 0.5-4-5 Hz) y theta ( $\theta$ , 4.5-7.5 Hz); posteriormente se encuentran las ondas alfa ( $\alpha$ , 7.5-13 Hz), beta ( $\beta$ , 13-30 Hz), y finalmente las ondas de alta frecuencia como gamma ( $\gamma_1$ , 35-55 Hz y  $\gamma_2$ , 65-100 Hz) (Müller Putz, 2020).

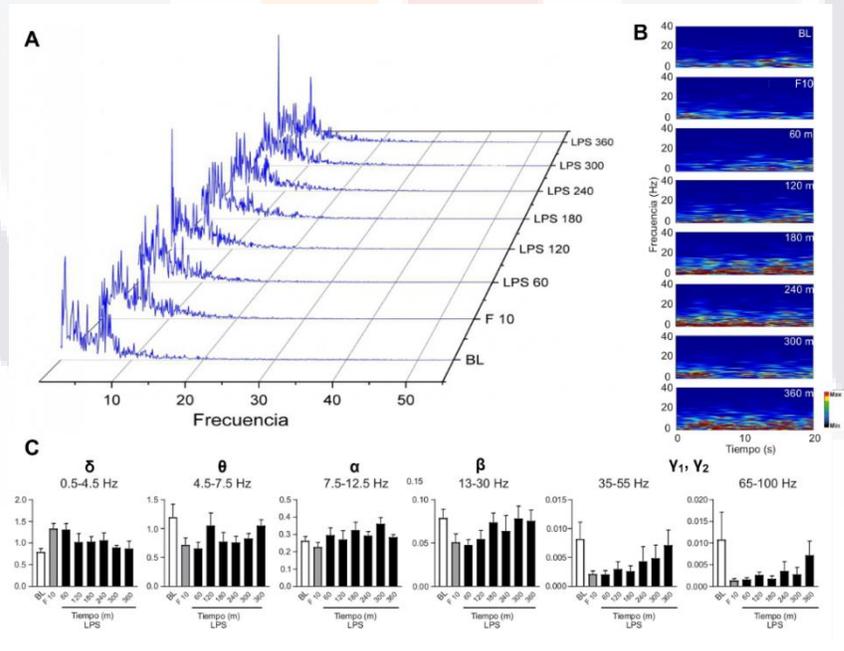
En la Figura 19 se observa la actividad eléctrica del hipocampo en ratas administradas con LPS. En la gráfica de Transformada Rápida de Fourier (Figura 19A), se puede observar un pico alto de baja frecuencia (theta) en la línea base el cual desaparece después de la administración de LPS. En la representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (Figura 19B) de igual forma se puede observar un ligero aumento de la actividad cerebral con respecto a la línea base. Con respecto a las frecuencias analizadas, las ondas delta se mantuvieron a lo largo del estudio, sin embargo, la actividad de tipo theta presenta una disminución considerable 1 h después de la administración de LPS como se puede observar en la Figura 19C y en el pico de la Figura 19A. Por otro lado, la actividad alfa y beta presentan un ligero aumento, mientras que gamma disminuye 2 h después de la administración de LPS (Figura 19C). Todos los resultados se comparan con respecto a la línea base.

En las ratas administradas con F10 + LPS se puede observar mayor actividad de baja frecuencia en la Figura 18A, donde se observan picos a las 2 h y 6 h. Esto también se comprueba en el espectro de potencia (Figura 20B). Las ondas delta tuvieron un aumento durante la primera hora, que disminuyó después de las 2 h. Las ondas alfa también tuvieron un ligero aumento con respecto a su línea base, mientras que beta se mantuvo a lo largo de todo el estudio. Sin embargo, las ondas theta se mantienen similares a su estado basal, mientras que las ondas gamma tienen una disminución drástica una vez administrada la F10 que va aumentando después de dicha administración (Figura 20C).

Comparando los dos grupos de ratas evaluados, las ondas de baja frecuencias como theta se ven afectadas con ambos tratamientos, ya que muestran una disminución considerablemente con LPS, mientras que con F10 + LPS, regresan a su actividad basal después de 2 h. Por otro lado, las ondas gamma también parecen tener una actividad distinta, ya que con LPS la disminución de estas ondas es gradual y comienza a aumentar después de las 4 h, mientras que con F10 + LPS la disminución se da una vez administrada F10 y a partir de 1 h comienza a aumentar la actividad.



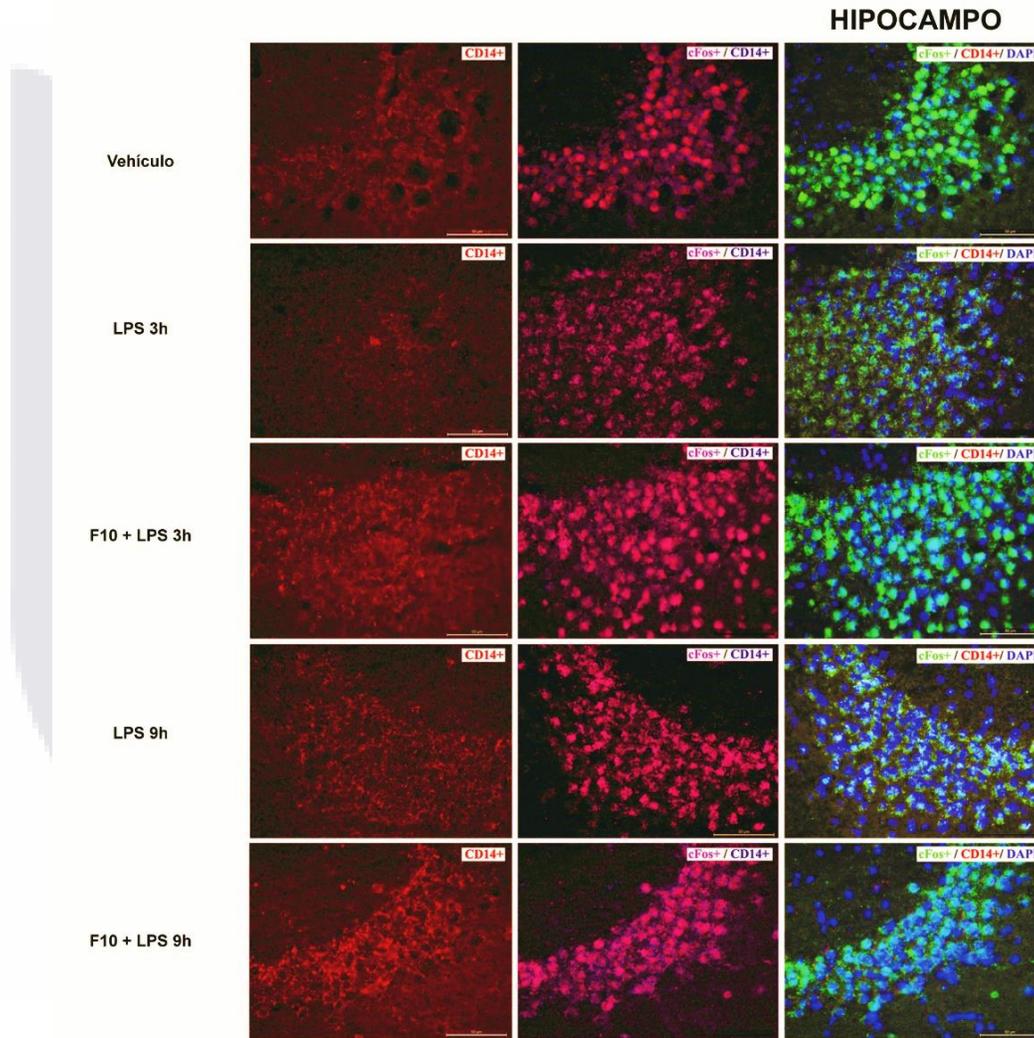
**Figura 19.** Actividad eléctrica del hipocampo en ratas administradas con LPS. A) Gráfica de Transformada Rápida de Fourier de 0-50 Hz de frecuencia. B) Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-40 Hz). C) Gráficas de barras para cada tipo de onda evaluada a distintos tiempos.



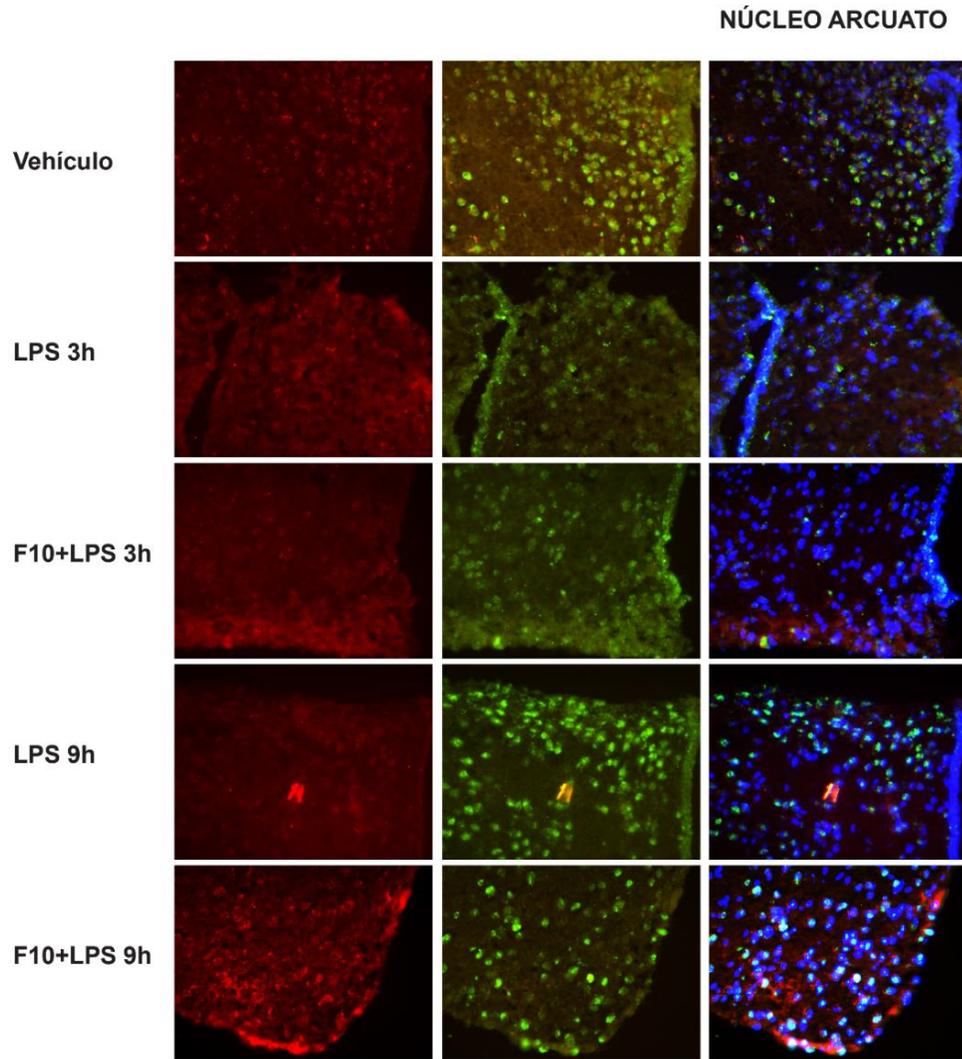
**Figura 20.** Actividad eléctrica del hipocampo en ratas administradas con F10 + LPS. A) Gráfica de Transformada Rápida de Fourier de 0-50 Hz de frecuencia. B) Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-40 Hz). C) Gráficas de barras para cada tipo de onda evaluada a distintos tiempos.

**6.7.3. Análisis histológico del gen de respuesta temprano cFos y de CD14 mediante hibridación in situ, en cortes de cerebro de ratones con LPS**

Se observó la presencia de ARNm para cFos y CD14 en varias regiones cerebrales, como el hipocampo (Figura 21) y el núcleo arcuato (Figura 22). Además, se encontró CD14 en la habénula, y la corteza piriforme. La señal fluorescente de ambos ARNm se observó tanto en los ratones vehículo como en aquellos con LPS y con F10 + LPS a ambos tiempos.

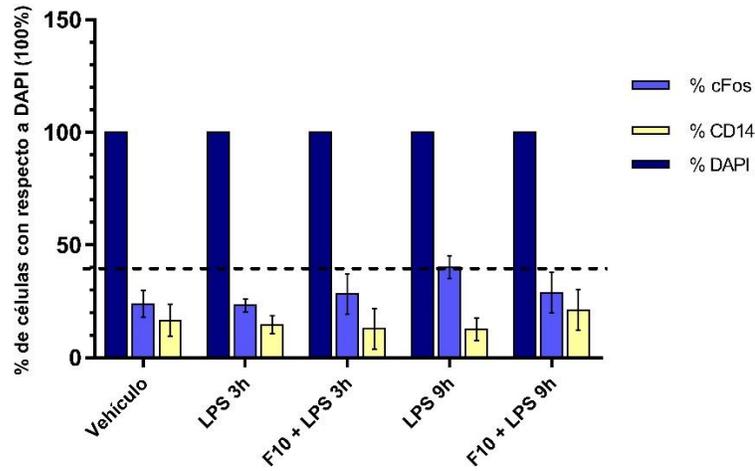


**Figura 21.** Distribución del ARNm para cFos y CD14 en la región CA3 del hipocampo. El filtro rojo indica la presencia de CD14, el filtro verde la presencia de cFos y el filtro azul indica la ubicación de los núcleos de las células neuronales teñidos con DAPI. En la primera columna se muestra en color rojo brillante la expresión de CD14. En la segunda columna se observa el contraste entre cFos (rosa) y CD14 (rojo brillante). En la tercera columna se observa la superposición de cFos (verde) y CD14 (rojo) con los núcleos celulares (azul).



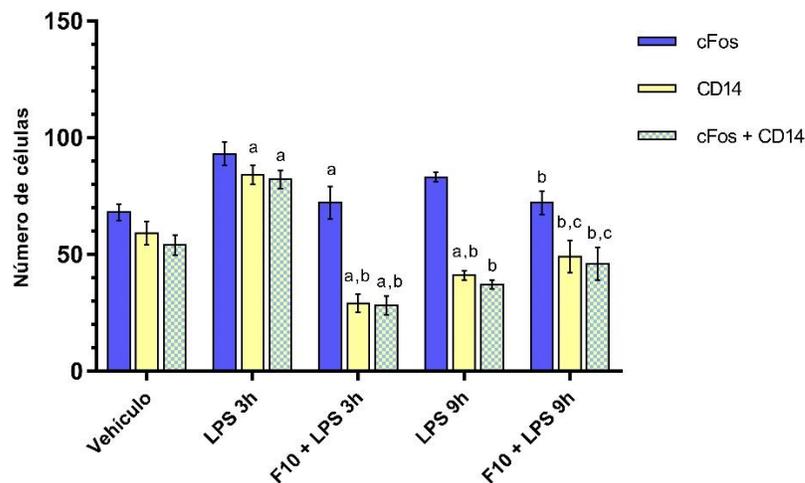
**Figura 22.** Distribución del ARNm para cFos y CD14 en el núcleo arcuato del hipocampo. El filtro rojo indica la presencia de CD14, el filtro verde la presencia de cFos y el filtro azul indica la ubicación de los núcleos de las células neuronales teñidos con DAPI. En la primera columna se muestra en color rojo brillante la expresión de CD14. En la segunda columna se observa en color verde la expresión de cFos. En la tercera columna se observa la superposición de cFos (verde) y CD14 (rojo) con los núcleos celulares (azul).

El análisis estadístico se llevó a cabo tomando la región del núcleo arcuato. En la Figura 23 se observa el porcentaje de células positivas a cFos o a CD14 tomando como 100% las células contadas mediante DAPI. Se puede observar que la población de células positivas a cFos es mayor que las de CD14, no obstante, el porcentaje es similar entre los grupos, dando entre el 23.21% al 40.09% para células positivas a cFos y entre 12.58% al 21.15% para las células positivas a CD14.



**Figura 23.** Porcentaje de células positivas a cFos o CD14 en el núcleo arcuato del hipotálamo La línea punteada indica que las células positivas a cFos y CD14 es menor que el 100% de las células contabilizadas mediante su tinción con DAPI.

En la Figura 24 se muestra el efecto de F10 sobre la expresión de cFos, CD14 y ambas, donde se puede observar diferencias significativas en la expresión de CD14 y cFos + CD14 en los grupos LPS 3h, F10+LPS 3 h y LPS 9h con respecto al vehículo (letra a); mientras que hay diferencias significativas entre LPS 3h con los demás grupos en donde se observa una reducción de las células positivas a CD14 y cFos+CD14 con la administración de F10 y con respecto al tiempo.



**Figura 24.** Efecto de F10 de *P. sacharosa* sobre la expresión de cFos y CD14 en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones expuestos al LPS. La letra “a” indica los grupos con diferencias significativas con respecto al vehículo; la letra “b” los grupos con diferencias significativas con respecto a grupo de LPS 3h; la letra c los grupos con diferencias significativas con respecto al F10 + LPS 3h.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Propagación *in vitro* de *P. sacharosa*

La propagación *in vitro* de plantas es una herramienta biotecnológica con una gran variedad de aplicaciones importantes como la obtención de material vegetal en periodos cortos de tiempo y en un ambiente controlado (Loyola Vargas & Ochoa Alejo, 2018). Las plantas propagadas *in vitro* de *P. sacharosa* a partir de explantes de tallo de 5 cm, tuvieron un crecimiento rápido, ya que en 3 meses se obtuvieron plántulas de hasta 13 cm de alto con una gran cantidad de hojas.

El medio MS es un medio rico en nutrientes que provee a la planta de todo lo necesario para su crecimiento (Murashige & Skoog, 1962). No obstante, los RCV, afectan los procesos de desarrollo en las plantas, principalmente en dosis bajas (Rademacher, 2015). Los más comunes son las auxinas y citocininas (Alcántara Cortes et al., 2019), ya que estas determinan el crecimiento de la planta y su posible micropropagación, así como respuestas de organogénesis, embriogénesis o inducción de tejido calloso (Pérez Molphe Balch et al., 2015).

Las citocininas estimulan la división celular y rompen la latencia de las yemas. En este caso, *P. sacharosa* es propagada mediante BA, una citocinina que, sola o en combinación con ANA, promueve la generación de brotes en una gran variedad de cactáceas reportadas por Pérez Molphe Balch (1998, 2015) como los géneros de *Mammillaria*, *Echinocactus*, *Coryphanta*, *Opuntia*, así como *Turbinicarpus* (Dávila Figueroa et al., 2005; Santos Díaz et al., 2022), entre otras. En *P. sacharosa*, se ha encontrado también que el carbón activado en combinación con BA promueve la generación de una mayor cantidad de hojas (Macías Martínez, 2017); además también se ha reportado el uso de BAP como citocinina para la micropropagación de plantas de *P. sacharosa*, donde la respuesta observada fue de organogénesis (Ruiz Velasco Martínez et al., 2022).

En general, la respuesta a los RCV también depende mucho de la planta y no todos generan la misma respuesta morfogénica al añadirse a distintos géneros e incluso distintas especies dentro de un mismo género. Un ejemplo se dio en las cactáceas *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis*, las cuales respondieron mejor a la formación de brotes con BAP (Pérez Molphe Balch & Dávila Figueroa, 2002), así como especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Melocactus*, *Mammillaria* y *Polaskia* con BAP o isopentiladenina (2iP).

### 7.2. Inducción y establecimiento de cultivos *in vitro* de tejido calloso

El tejido calloso también se induce mediante la adición de RCV. Una proporción de auxinas mayor a la de citocininas es ideal para la inducción de este tipo de tejido, ya que las primeras estimulan la

formación de tejidos no diferenciados, mientras que las segundas estimulan la rápida división celular (Saran et al., 2013). Sin embargo, las características del callo formado dependerán del explante utilizado para su inducción, de la especie y de los RCV que se utilicen (Saran et al., 2013).

En el caso de *P. sacharosa* se probaron dos tratamientos con ANA como auxina y dos distintas citocininas: Picloram o TDZ. La inducción se dio con ANA+TDZ tanto en explantes de hojas como de tallo, mientras que con Picloram no se obtuvo tejido calloso, tal como lo reportado por Macías Martínez (2017). En un estudio de Aguiar Lage et al (2015), se utilizaron diversos RCV tales como el ANA, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o Picloram para la obtención de callos de *P. aculeata*, en donde encontraron que el Picloram solo, obtuvo una mayor producción de este tejido, incluso después de la adición de CIN o BAP. Lo mismo ocurre con otro tipo de plantas no cactáceas como *Gerbera jamesonii*, donde se encontró que los tratamientos con Picloram y 2,4-D+ANA indujeron la producción de tejido calloso (Gantait & Mahanta, 2021). Por el contrario, en *P. sacharosa* el Picloram no tuvo este efecto dando como resultado favorable, el uso de TDZ. En diversas plantas se ha visto que el TDZ es un regulador eficiente en la producción de callos; en *Lycium barbarum*, se encontró que la inducción se dio con TDZ+ácido indolacético (AIA) (Karakas, 2020); mientras que con fresa silvestre (*Fragaria vesca*) la inducción se dio con TDZ+2,4-D (Chung & Ouyang, 2020). En la planta de azafrán (*Crocus sativus*), las diferentes combinaciones de TDZ+ANA dieron un 100% de inducción de tejido calloso (Moradi et al., 2018), al igual que lo obtenido con *P. sacharosa*.

El uso de los RCV además puede promover la acumulación de metabolitos secundarios importantes, ya que las características del tejido calloso inducido pueden ser distintas dependiendo del explante y los RCV utilizados. Se ha encontrado que el TDZ indujo la producción de compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, quercetina, arctigenina y camferol, en tejido calloso de *Ipomoea turbinata* (Ahmad et al., 2019). Por otro lado, en *Lycium barbarum*, la combinación de BA+ANA aumentó la producción de ácido clorogénico y ácido cafeico, mientras que el uso de TDZ aumentó la síntesis de ácido vanílico, rutina, ácido gálico y quercetina (Karakas, 2020). En *Camellia sinensis* se encontró que con ANA se elevó la producción de compuestos fenólicos y flavanos (Nikolaeva et al., 2009); en *Crocus sativus*, la combinación TDZ+ANA dio una mayor producción de ésteres de crocina (Moradi et al., 2018), y en *Artemisia absinthium* se obtuvo una mayor cantidad de compuestos fenólicos con actividad antioxidante mediante el uso de TDZ (Ali & Abbasi, 2014). Finalmente, en *P. aculeata* se obtuvieron callos productores de betalainas con Picloram (de Aguiar Lage et al., 2015). Esto da la pauta para evaluar diversas combinaciones de RCV en *P. sacharosa*, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de metabolitos secundarios con interés farmacéutico.

### 7.3. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de *P. sacharosa*

Para la evaluación de la cinética de crecimiento del tejido calloso se tomó el tejido obtenido del tallo, ya que, aunque la inducción se dio al mismo tiempo que con el proveniente de la hoja, el tejido calloso del tallo presentó una mayor biomasa y friabilidad. Esto es importante debido a que al tener más biomasa se puede obtener una mayor cantidad de extracto, así como de metabolitos secundarios, mientras que la friabilidad, es decir, la capacidad de los callos a disgregarse, es importante al momento del establecimiento de cultivos de células vegetales en suspensión, cultivos que son mayormente utilizados para la producción de compuestos de interés comercial como los metabolitos secundarios con actividad biológica (Saran et al., 2013).

La cinética de crecimiento se evaluó durante 40 días, caracterizada por tres fases importantes del crecimiento: fase lag o adaptación al medio hasta el día 7, fase de crecimiento exponencial hasta el día 30 y fase estacionaria hasta el día 40, posterior a ésta, continúa la fase de muerte del tejido. La fase de crecimiento exponencial indica la rapidez con la que el tejido crece debido al aprovechamiento de los nutrientes del medio, por lo que al final de esta fase (30 días) se obtiene la biomasa máxima, la cual fue de 17 g L<sup>-1</sup> de biomasa seca. Macías-Martínez (2017) determinó que la biomasa máxima para el tejido calloso del tallo de *P. sacharosa* fue de 0.334 g en 38 días lo que indica que el crecimiento después del día 30 es más lento, característica del inicio de la fase estacionaria. Con respecto a los parámetros cinéticos, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.07 días<sup>-1</sup>, el tiempo de duplicación de 10 días y el índice de crecimiento de 3.03; similar a lo obtenido por Macías-Martínez.

La cinética de crecimiento de los callos es importante para decidir el manejo del cultivo de callos, principalmente para decidir cuándo se deben subcultivar, recolectar y determinar cuándo se producirá una gran cantidad de metabolitos secundarios (da Luz Costa et al., 2015). El momento óptimo para realizar subcultivos de este tejido calloso, el cual sería alrededor del día 12, es decir, a la mitad de la fase de crecimiento exponencial, con la finalidad de que este tejido se mantenga en dicha fase y continúe obteniéndose la mayor cantidad de biomasa, sin sobrepasar el día 30 final de la fase de crecimiento, debido a la reducción de nutrientes, pérdida de agua del medio de cultivo, y acumulación de sustancias tóxicas (da Luz Costa et al., 2015). Por otro lado, la recolección de material vegetal se realizaría el día 30 con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa y metabolitos secundarios, ya que el período ideal para la extracción de estos compuestos es la fase estacionaria, cuando cesa la producción de metabolitos primarios; sin embargo, se deben realizar estudios de metabolitos secundarios a la par de la cinética de crecimiento (da Luz Costa et al., 2015). Por ejemplo, en el estudio de Ali et al (2014), la biomasa máxima de callos de *Artemisia absinthium* y fin de la fase de crecimiento se dio en el día 42, día en el que también se observó la mayor acumulación de compuestos fenólicos; mientras que Pan et al (2020) encontraron que los callos de

*Bletilla striata* tuvieron una biomasa máxima en el día 24 y sus metabolitos secundarios como coelonina, dactilorrina y alcohol p-hidroxibencílico tuvieron una concentración máxima los días 18, 24 y 39, respectivamente.

#### **7.4. Elaboración de extractos de hojas de la planta aclimatada y de tejido calloso**

En la extracción sólido-líquido, que a menudo se denomina maceración, el disolvente tiene un impacto importante en la selectividad. Su polaridad tiene una influencia directa en los solutos extraídos, relacionada con la estructura química de los compuestos (Lefebvre et al., 2021). En este caso, el mayor rendimiento se obtuvo con el extracto metanólico gracias a su capacidad para extraer compuestos tanto polares como apolares. Por la misma razón, el siguiente solvente con mayor rendimiento fue el etanólico, siguiendo el cloroformo y finalmente el hexano, el cual extrae compuestos estrictamente apolares debido a su naturaleza hidrofóbica.

#### **7.5. Fraccionamiento del extracto etanólico de *P. sacharosa* mediante cromatografía en columna abierta y análisis por CCF**

El extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* se sometió a cromatografía en columna abierta para obtener fracciones más puras con una menor cantidad de compuestos, pero más concentrados, que los que posee el extracto. Este fraccionamiento se llevó a cabo en fase normal con un gradiente de polaridad de cloroformo:metanol. El cloroformo es un solvente apolar por lo que extrae compuestos similares, altamente polares e hidrofóbicos; por el contrario, el metanol extrae compuestos hidrofílicos, al ser un solvente con alta polaridad (Lefebvre et al., 2021).

En las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *P. sacharosa*, se pudieron observar una gran variedad de compuestos desde apolares hasta polares. Debido a su estructura química, los terpenos, saponinas y esteroides son esencialmente compuestos apolares, mientras que los flavonoides son polares; las cumarinas y otros compuestos fenólicos pueden tener polaridad diversa debido a distintos grupos funcionales en sus estructuras. En F10 se observaron grupos de cumarinas, fenoles, saponinas esteroidales y terpenos; además, al comparar con un estándar de camferol, se puede observar ligeramente la presencia de éste flavonoide, no obstante puede estar opacado por compuestos más concentrados, vistos de color rojo a la luz UV, tales como las cumarinas. Con los reactivos AS y LB, se observa una banda de color violeta al mismo Rf, lo que indica la presencia fuerte de un compuesto de tipo terpenoide.

En otras plantas de *Pereskia*, se ha encontrado también una gran diversidad de compuestos. En *P. lychnidiflora* se han encontrado grupos de alcaloides, taninos, terpenoides y esteroides (Guerra et al.,

2018). En *P. aculeata* se han encontrado cumarinas, compuestos fenólicos como flavonoides y taninos, esteroides, terpenos e hidrocarburos (Egea & Pierce, 2021; Maciel et al., 2021). *P. bleo* posee alcaloides, flavonoides, esteroides, ácidos grasos, compuestos fenólicos y terpenoides (Mohd Salleh et al., 2020). En *P. grandifolia* se han encontrado saponinas, esteroides, alcaloides y compuestos fenólicos como taninos y flavonoides (Kazama et al., 2012; Nurestri et al., 2009). Para *P. sacharosa*, no hay información disponible sobre los grupos de compuestos que esta planta posee.

#### **7.6. Análisis de posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas, de callos y F10 de *P. sacharosa* mediante CCF**

Como ya se discutió, el extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* posee una gran variedad de grupos de compuestos que también se encuentran presentes en el extracto etanólico de callos y son similares a los presentes en F10. No obstante, el tejido calloso, al estar cultivado en condiciones *in vitro*, puede no producir los mismos metabolitos que una planta expuesta al medio ambiente donde los factores bióticos y abióticos puedan causarle estrés que la conduzca a una alta producción de metabolitos secundarios como defensa; además generalmente, los metabolitos secundarios representan menos del 1% del peso seco de las células vegetales (Georgiev et al., 2009). Estos factores afectan la producción de metabolitos en el tejido calloso, no obstante, muchos de estos compuestos siguen sintetizándose en bajas cantidades y pueden verse afectados también por el uso de RCV, como ya se discutió anteriormente, por lo que puede someterse el tejido a un estrés abiótico o bien, suministrar inductores que permitan la síntesis de los metabolitos secundarios de interés. Además, pueden seleccionarse líneas celulares productoras de metabolitos secundarios desde el momento de su establecimiento, proceso que es más común en callos que sintetizan compuestos coloridos como las betalainas (de Aguiar Lage et al., 2015; Georgiev et al., 2009).

#### **7.7. Análisis del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico y fracciones de *P. sacharosa* en ratones adultos de las cepas CD1 y C57BL/6JN, sometidos a neuroinflamación con LPS**

##### **7.7.1. Fluorescencia de F10 y su presencia en el cerebro de ratón**

La F10 fue utilizada para los bioensayos debido a que se comprobó la presencia de camferol mediante CCF. Para utilizar dicha fracción, se evaluó su integridad una vez que ésta fue resuspendida en el vehículo de administración para el modelo animal. El vehículo consistió en SSI y Tween 80; este último debido a que F10 posee tanto compuestos polares como no polares, por lo que el Tween 80, como surfactante, permitió la disolución de ambos tipos de compuestos en la SSI.

La integridad de F10 fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Se observó que, a bajas temperaturas, F10 sigue manteniendo la fluorescencia a diferencia de F10 almacenada a temperatura ambiente. Por lo tanto, los extractos vegetales, deben almacenarse protegidos de la luz y en refrigeración para evitar la degradación de compuestos con actividad biológica, tal como se observó con la fluorescencia de F10.

Como ya se mencionó, los extractos vegetales poseen una gran variedad de compuestos como terpenos, esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, etc. La estabilidad de estos compuestos depende de factores como el pH, la luz, la temperatura y el solvente (Gafner & Bergeron, 2005). Los compuestos fenólicos pueden degradarse en pH básico, presencia de luz y radiación. Por ejemplo, los rayos UV promueven reacciones redox que disminuyen el contenido de fenoles como los flavonoides (de la Rosa et al., 2019; Gafner & Bergeron, 2005). Por otro lado, la temperatura acelera reacciones enzimáticas que pueden degradar o modificar la estructura de metabolitos secundarios en general (Gafner & Bergeron, 2005). En el caso de solventes como el agua, la formación de radicales libres también ocasiona reacciones tipo redox que dañan los compuestos fenólicos (Gafner & Bergeron, 2005).

No obstante, la gran diversidad de compuestos que existen en las plantas puede determinar una integridad y estabilidad mayor o menor dependiendo de dichos compuestos. Por ejemplo, un extracto etanólico de *Spondias mombin* fue evaluado durante un año, almacenado en viales ámbar a temperatura ambiente, y se encontró que el pH fue ligeramente ácido durante toda la prueba lo que indicó baja degradación de compuestos fenólicos (Pérez Portero et al., 2021). No existe información de estabilidad de extractos de las especies de *Pereskia*, sin embargo, en *Opuntia dillenii*, una cactácea, el pH y la luz afectaron significativamente el contenido de betalainas en soluciones acuosas, donde la solución es más estable a pH 5.0 y en ausencia de luz (Betancour et al., 2016).

En extractos etanólicos de hojas moringa (*Moringa oleifera*), hojas de menta (*Mentha spicata*) y zanahoria (*Daucus carota*), se encontró que su actividad antioxidante fue mayor a pH 4 que a pH 9 por la degradación de los compuestos fenólicos, sin embargo, solo el extracto de zanahoria fue termoestable hasta 100 °C y los tres extractos almacenados a 5 y 25 °C en oscuridad después de 15 días, no mostraron ningún cambio (Arabshahi et al., 2007). Los terpenos, también se ven afectados por el calor, principalmente. En extractos de *Cymbopogon citratus*, se observó que la concentración de citral, un monoterpene, fue disminuyendo conforme a la exposición de los extractos al calor hasta en un 40% durante un mes, un 30% con su exposición a la luz y un 100% a pH ácido y básico. Además, los extractos solo se mantuvieron durante 3 meses en lugares frescos y protegidos de la luz (Rodríguez Chanfrau et al., 2003).

Actualmente, existen varias tecnologías que pretenden evitar el uso de solventes tóxicos para la extracción, así como de aplicar técnicas que eviten la degradación de los compuestos bioactivos de

los extractos ya sea por luz, calor o enzimas. Ejemplos de estas tecnologías son: portadores coloidales, microencapsulación por evaporación de solventes o encapsulación por nanopartículas, gelificación iónica (donde también se evita el uso de surfactantes) (Armendáriz Barragán et al., 2016).

La fluorescencia de flavonoides tales como la quercetina, miricetina y camferol ya ha sido investigada (Monago Maraña et al., 2016). Como se observó en la Figura 17, F10 atraviesa la barrera hematoencefálica y se localizó tanto en el tercer ventrículo del cerebro como en los ventrículos laterales. En el estudio de Ruiz-Velasco-Martínez (2022), se observó que efectivamente los compuestos de los extractos y fracciones de *P. sacharosa* atraviesan la barrera hematoencefálica en ratones administrados con estos. Además se comprobó la presencia de camferol mediante HPLC-MS y mediante la señal de camferol en el tercer ventrículo del cerebro de ratón como se observó en la Figura 18. Se ha encontrado que las excitaciones óptimas de los flavonoides se encuentran dentro del rango de 460 a 480 nm, con emisión azul y verde, sin embargo, del camferol se encuentra alrededor de los 600 nm (Donaldson, 2020). Además, se ha informado que los flavonoides pueden formar complejos con albúminas lo que puede aumentar su fluorescencia, aunque la disminución en el pH, por ejemplo al agregar SSI, pueden disminuirla (Poór et al., 2018).

En general, se ha encontrado que metabolitos derivados de plantas pueden atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer efectos directos sobre las neuronas, los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos para proteger estas células cerebrales de los estímulos dañinos o mejorar los déficits neurológicos (Welcome, 2020). Un estudio de polifenoles de la zarzamora, donde se encontró camferol, mostró que estos atraviesan la barrera hematoencefálica y ofrecen una actividad neuroprotectora (Figueira et al., 2019). Anteriormente, ya se ha informado que el camferol actúa como un agente antiinflamatorio en la neuroinflamación inducida por LPS vía TLR4/MyD88 y disminuyendo la fosforilación y la transposición nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, inhibiendo así la expresión de varias proteínas proinflamatorias (Cheng et al., 2018; W. H. Li et al., 2019).

### **7.7.2. Actividad cerebral en ratas con LPS mediante EEG**

El protocolo de aplicación de LPS se ha utilizado ampliamente para provocar inflamación sistémica con neuroinflamación (Alvares Batista et al., 2019). Esta neuroinflamación es una característica importante en la patogenia y progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el delirio, la demencia, entre otras (Nava Catorce & Gevorkian, 2016).

La EEG es una de las herramientas más influyentes disponibles para evaluar la función neurofisiológica, y esta mantiene un alto grado de complejidad en condiciones normales y anormales,

por lo que la interpretación precisa se ve facilitada mediante las ondas en el registro (Mari Acevedo et al., 2019). Actualmente, la información sobre la actividad cerebral en ratas sometidas a neuroinflamación con LPS y el efecto de *P. sacharosa* sobre dicho desafío inmunológico, es limitada. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en las ratas sometidas a neuroinflamación con LPS, se analizaron las ondas con principales cambios, tales como las ondas delta, theta y gamma.

Las ondas delta se mantuvieron a lo largo de las 6 h en las ratas administradas solo con LPS, mientras que en las ratas con F10 de *P. sacharosa* se observó un aumento al inicio (1 h) que disminuyó después de las 2 h. El rango delta está relacionado con el sueño profundo e inconsciente, es decir, la fase lenta del sueño; además se asocia con estados neurales patológicos tales como el coma y la pérdida de conocimiento (Mari Acevedo et al., 2019; Müller Putz, 2020). En las ratas con F10, la disminución de las ondas delta representaría mayor actividad. Según Mamad et al (2018) el rango delta aumenta en ratas con LPS y es común en pacientes con delirio.

Las ondas de tipo theta mostraron una disminución importante en los animales administrados con solo LPS con respecto a su línea basal. Esta disminución se mantuvo hasta las 6 h. Por otro lado, en los animales administrados con F10, estas ondas disminuyeron a 1 h después de la administración del LPS y volvieron a aumentar a las 2 h, similar a la línea basal.

Se ha encontrado que el ritmo theta si disminuye considerablemente en modelos animales sometidos a neuroinflamación con LPS, y esta disminución, no está relacionada con la disminución de la actividad locomotora del animal (Mamad et al., 2018). Las ondas theta están relacionadas con el movimiento voluntario, estados de sueño, somnolencia y vigilia relajada, así como con el esfuerzo mental, el estado de alerta y la atención dirigida a un estímulo (Müller Putz, 2020). Al encontrarse las ondas theta similares a la línea basal en los animales administrados con F10, el malestar asociado al LPS se encuentra reducido por lo que estos animales pueden relajarse y estar alerta; al contrario de los animales sin F10 que se encuentran en un desafío inmunológico y por lo tanto tienen sueño limitado y bajo estado de alerta (Mari Acevedo et al., 2019). Según Mamad et al. (2018), el ritmo theta del hipocampo es un indicador preciso de los cambios oscilatorios provocados por la aplicación de LPS.

Se ha establecido que el hipocampo es un generador de ondas theta, así como la corteza prefrontal, región que está conectada con el hipocampo a través de la vía hipocampal-prefrontal (Soltani Zangbar et al., 2020). Las oscilaciones theta se transmiten del hipocampo a la corteza y sincronizan simultáneamente la actividad de estas dos regiones durante los ciclos de sueño-vigilia, la memoria, el aprendizaje y otras tareas cognitivas como la ansiedad (Soltani Zangbar et al., 2020). Por lo tanto, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, se presenta una disminución en las ondas theta (Ahnaou et al., 2017).

Por otro lado, el SNC regula de manera coordinada la inflamación y el sueño a través de múltiples mecanismos (Besedovsky et al., 2012). Los niveles elevados de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$  en la sangre y el cerebro desencadenan mecanismos de defensa inmunitaria y comportamientos adaptativos, incluido el sueño, al actuar sobre varios circuitos neurales reguladores del sueño (Irwin & Opp, 2017). Durante el sueño, los niveles séricos de TNF- $\alpha$  disminuyen pero, existe evidencia de un aumento durante la noche en la capacidad de los monocitos para responder a la activación de TLR-4 con LPS (Rockstrom et al., 2018). Por consiguiente, el sueño nocturno favorece la defensa inmunológica frente a un desafío microbiano (Besedovsky et al., 2012).

Se ha encontrado que las ondas gamma si disminuyen con la administración del LPS (Sultan et al., 2021). En un estudio realizado por Hua et al (2022), el extracto etanólico de *Lonicerae Japonicae* mostró una disminución de las citocinas proinflamatorias y una mejora del sueño en ratones privados del sueño y sometidos a inflamación con LPS; el EEG no mostró diferencias en las ondas delta, pero si en las gamma, las cuales se vieron reducidas considerablemente con la administración del extracto. Esto coincide con los datos obtenidos, en donde el ritmo gamma disminuye drásticamente desde la administración de F10 y pretende volver al estado basal, mejorando el sueño y manteniendo el proceso inflamatorio activo. Estos hallazgos demuestran que *P. sacharosa* disminuye el malestar de los animales sometidos a neuroinflamación.

### **7.7.3. Análisis histológico del gen de respuesta temprano cFos y de CD14 mediante hibridación in situ, en cortes de cerebro de ratones con LPS**

En los ratones evaluados, se encontró que el ARNm para cFos y CD14 se expresó en todos los grupos evaluados, lo que indica que la actividad neuronal esta activa. Esta señal se observó en varias regiones cerebrales tales como el hipocampo, el hipotálamo, la corteza piriforme y la habénula. El núcleo arcuato del hipotálamo es una región importante al evaluar la expresión de estos ARNm, ya que se encuentra próximo al tercer ventrículo del cerebro, en donde se localizó F10 mediante fluorescencia y en donde se encuentran los tanicitos, células gliales que se conectan con el hipotálamo y que representan la primera defensa contra patógenos en la barrera hematoencefálica (Goodman & Hajihosseini, 2015). Además, el núcleo arcuato es rico en receptores glucosídicos que pueden aceptar compuestos como el camferol cuando este se encuentra glucosilado (como el camferol-3-O- $\beta$ -rutinósido, entre otros).

Comparando la expresión del ARNm para cFos y CD14, se encontró una disminución de las células que responden a ambos ARNm en el grupo F10+LPS a las 3 h. Esta disminución también se observó a las 9 h, independientemente de la administración de F10, lo que indica que la enfermedad se encuentra en su etapa final. Por lo tanto, F10 puede disminuir los signos de inflamación a tiempos

tempranos (3 h), ahorrando 6 h de malestar al animal, resultados que se correlacionan con la actividad cerebral vista en ratas.

El gen cFos es un gen de respuesta temprana, es decir, un gen que se activa de forma transitoria, principalmente a nivel transcripcional, como respuesta a un estímulo presente y que, posteriormente, encenderá una vía para la activación de genes de respuesta tardía (Hudson, 2018). En las neuronas, cFos se activa cuando hay actividad, es decir, cuando las neuronas están sometidas a despolarización, potenciales de acción y sinapsis, lo que quiere decir que un estímulo las está activando (Kovács, 2008). La expresión de cFos comienza dentro de los 15 min posteriores a la estimulación, con una expresión máxima del ARNm de aproximadamente 30 min después del estímulo (Kovács, 1998).

En este caso, el LPS representa dicho estímulo y se ha encontrado que cFos se activa con esta endotoxina en distintas estructuras cerebrales como el hipotálamo (incluyendo el núcleo arcuato y el núcleo paraventricular) (Gavrilov et al., 2008; Wanner et al., 2013) y el hipocampo (Peng et al., 2019). Por lo tanto, este gen se utiliza para identificar regiones cerebrales que están implicadas en el estímulo dado. Estudios han mostrado que la expresión del ARNm de cFos mediante hibridación *in situ* en el núcleo paraventricular se dio a las 2 h y paralelamente a la expresión de citocinas proinflamatorias en los órganos circunventriculares, en ratas con LPS (Quan et al., 1998, 1999).

El hipotálamo y el hipocampo son estructuras clave para la expresión y función de las citocinas cerebrales y están implicados en procesos cognitivos, emocionales, conductuales y alteraciones motivacionales del comportamiento de enfermedad inducido por citocinas, así como la respuesta fisiológica a la infección aguda (André et al., 2008; Gądek-Michalska et al., 2013). Específicamente, el hipotálamo participa en el control del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA), en la respuesta al estrés y coordina funciones fisiológicas como el sueño y la alimentación, las cuales son alteradas por la respuesta inflamatoria (Alboni et al., 2013).

cFos también se activa en las células inmunes del SNC, tales como los astrocitos, oligodendrocitos y la microglía (Cruz Mendoza et al., 2022). A diferencia de las neuronas, estas células activan cFos bajo la influencia de la proliferación, diferenciación, crecimiento, inflamación, reparación, daño, plasticidad y otras condiciones (Cruz Mendoza et al., 2022). En la microglía, esta activación de cFos también está asociada con el LPS tanto en ratas como ratones y localizado principalmente en el hipocampo y el hipotálamo (Rigillo et al., 2018), lo que implica una herramienta poderosa para dilucidar las respuestas inflamatorias que se llevan a cabo en el cerebro (Cruz Mendoza et al., 2022).

El aumento considerable de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como de cFos en estructuras como el hipotálamo y el hipocampo, se desencadena gracias al receptor TLR4 y el

receptor de LPS, CD14 (Cavaillon, 2018; Rigillo et al., 2018; Xia et al., 2006), lo que implica que CD14 es clave en la inducción de la respuesta inflamatoria.

Una gran cantidad de plantas y sus metabolitos secundarios han sido evaluadas por su actividad antiinflamatoria en el SNC y desordenes neurológicos, las cuales actúan principalmente sobre la vía de NF- $\kappa$ B, dentro de estos se encuentran principalmente los flavonoides, pero también otros metabolitos (Kumazawa et al., 2006). Por ejemplo, el 6-gingerol del jengibre puede reducir la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Imran et al., 2021). Los metabolitos de *Bunchosia armeniaca* como la quercetina, la apigenina, la baicalina, la vitexina y el resveratrol previenen el deterioro de la memoria, posiblemente a través de su efecto antioxidante y antiinflamatorio (Abbas et al., 2022). El sulforafano del brócoli (*Brassica oleracea var*), el canabidiol de las especies de *Cannabis*, el carvacrol y timol del orégano (*Origanum vulgare*) inhiben la activación inducida por LPS de la vía de señalización NF- $\kappa$ B y las secreciones de proteínas inflamatorias (dos Santos Pereira et al., 2020; Gholijani et al., 2016; Somensi et al., 2019; Subedi et al., 2019). El ácido rosmarínico de la familia *Lamiaceae* y la curcumina de la cúrcuma inhiben la expresión de TLR4, CD14 y NF- $\kappa$ B (Wei et al., 2018; Zhang et al., 2019) y el TLR4 no solo se ha asociado a la respuesta inflamatoria, sino también al dolor (Li et al., 2016).

La actividad antiinflamatoria en géneros de *Pereskia* se ha encontrado en *P. aculeata* (de Castro Campos Pinto, Machado, et al., 2015), sin embargo, la actividad antinociceptiva se ha informado en *P. aculeata* (de Castro Campos Pinto, do Nascimento Duque, et al., 2015), *P. lychnidiflora* (Guerra et al., 2018), *P. bleo* (C. Guilhon et al., 2012), así como *P. sacharosa* (Ruiz Velasco Martínez et al., 2022). La sensación de dolor puede ser controlada de manera efectiva por sistemas de neurotransmisores como los sistemas oxidonitrérgicos, opioides, colinérgicos, entre otros. Los mecanismos antinociceptivos descritos en plantas de *Pereskia* mencionan principalmente la vía de los receptores opioides, aunque también los receptores colinérgicos, vainilloides y de glutamato (de Castro Campos Pinto, do Nascimento Duque, et al., 2015; Guilhon et al., 2015). En el estudio realizado por Ruiz-Velasco-Martínez et al. (2022), encontraron que la actividad antinociceptiva de *P. sacharosa* era inhibida por naltrexona (antagonista de los receptores opioides), flumazenil (antagonista del receptor del ácido gamma-aminobutírico A, GABAA) o WAY100635 (antagonista del receptor 5-hidroxitriptamina 1A, 5-HT1A), por lo que da la pauta para proponer un mecanismo en el que los compuestos de *P. sacharosa* actúen como antinociceptivos.

Con los datos obtenidos sobre la expresión de cFos y CD14 en el cerebro de los ratones evaluados, así como con los datos electroencefalográficos se puede observar la disminución de los síntomas y signos de inflamación en los animales aún con la enfermedad activa, lo que permite el regreso temprano de la actividad ambulatoria y bienestar del animal, lo que indicaría una actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de *P. sacharosa*.

## 8. CONCLUSIONES

Se establecieron cultivos *in vitro* de tejido calloso de *P. sacharosa* a partir de explantes de tallo y utilizando TDZ y ANA como RCV. La cinética de crecimiento mostró una biomasa máxima a los 30 días, tiempo en el que el tejido calloso puede ser recolectado.

La F10 obtenida del extracto etanólico de hojas de *P. sacharosa* posee una gran variedad de compuestos de tipo fenólicos (incluyendo flavonoides como el camferol), terpenoides, esteroides y saponinas. La comparación entre el extracto etanólico de callos, de hojas y F10 tuvo similitudes en cuanto a flavonoides y terpenos. Este tipo de compuestos pueden ser sensibles a la luz y el calor, por lo que los extractos vegetales deben almacenarse protegidos de la luz y en refrigeración para evitar la degradación de compuestos con actividad biológica.

Los compuestos de F10 de *P. sacharosa* logran atravesar la barrera hematoencefálica en el SNC de ratones y localizarse en los ventrículos cerebrales. Esta señal es similar al de un estándar de camferol, flavonoide presente en F10.

La actividad cerebral en el hipocampo de ratas con LPS mostró principalmente una disminución de las ondas de baja frecuencia como theta, con respecto a su línea basal; mientras que con F10 la actividad theta se mantuvo similar a la línea base, mostrando que con F10 las ratas se encuentran realizando las actividades propias de las ondas theta, tales como el movimiento voluntario, la vigilia relajada y la atención dirigida a un estímulo.

La señal de los ARNm para cFos y CD14 se encontró en varias regiones cerebrales tales como el hipocampo y el hipotálamo. La señal de cFos y CD14 se mantuvo presente con F10 y hasta 9 h después. No obstante, en el núcleo arcuato del hipotálamo, las células con cFos y CD14 disminuyeron con la presencia de F10 a las 3 h.

Finalmente, estos hallazgos indican que los compuestos en F10 de *P. sacharosa* disminuyen los signos de inflamación a tiempos tempranos, permitiendo el regreso temprano de la actividad ambulatoria del animal aún con la enfermedad activa.

## 9. REFERENCIAS

- Abbas, H. A., Salama, A. M., El-Toumy, S. A., A. Salama, A. A., Tadros, S. H., & El Gedaily, R. A. (2022). Novel neuroprotective potential of *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC against lipopolysaccharide induced Alzheimer's disease in mice. *Plants*, 11(14), 1792. <https://doi.org/10.3390/plants11141792>
- Abdul Wahab, R. I., Carvalho Guilhon, C., Fernandes, P., Boylan, F., Rahayu Abdul-Wahab, I., & Dias Fernandes, P. (2012). Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. *Article in Journal of Ethnopharmacology*, 144, 741–746. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.029>
- Agostini Costa, T. da S., Wondracek, D. C., Rocha, W. da S., & Silva, D. B. da. (2012). Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34, 234–238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000100031>
- Ahmad, W., Zahir, A., Nadeem, M., Zia, M., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Thidiazuron-induced efficient biosynthesis of phenolic compounds in callus culture of *Ipomoea turbinata* Lagasca and Segura. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(6), 710–719. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10027-1>
- Ahnaou, A., Moechars, D., Raeymaekers, L., Biermans, R., Manyakov, N. v., Bottelbergs, A., Wintmolders, C., van Kolen, K., van de Castele, T., Kemp, J. A., & Drinkenburg, W. H. (2017). Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Scientific Reports*, 7(1), 14189. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13839-6>
- Alboni, S., Benatti, C., Montanari, C., Tascetta, F., & Brunello, N. (2013). Chronic antidepressant treatments resulted in altered expression of genes involved in inflammation in the rat hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, 721(1–3), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.046>
- Alcantara Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.25058/24629448.3639>
- Aldapa Vega, G., Pastelín Palacios, R., Isibasi, A., Moreno Eutimio, M. A., & López Macías, C. (2016). Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. *Revista Alergia México*, 63(3), 293–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.29262/ram.v63i3.207>

- Ali, M., & Abbasi, B. H. (2014). Thidiazuron-induced changes in biomass parameters, total phenolic content, and antioxidant activity in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2363–2376. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0663-7>
- Almeida, M. E. F. de, & Corrêa, A. D. (2012). Utilization of cacti of the genus *Pereskia* in the human diet in a municipality of Minas Gerais. *Ciencia Rural*, 42(4), 751–756. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000400029>
- Alvares Batista, C. R., Freitas Gomes, G., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. C. P. (2019). Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Anderson, Edward. F. (2001). *The Cactus Family*. Timber Press.
- André, C., O'Connor, J. C., Kelley, K. W., Lestage, J., Dantzer, R., & Castanon, N. (2008). Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *Journal of Neuroimmunology*, 200(1–2), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.011>
- Arabshahi, S., Vishalakshi Devi, D., & Urooj, A. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, 100(3), 1100–1105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.014>
- Armendáriz Barragán, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo Rodríguez, S. A., Kabbaj, D., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8), 1165–1175. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487>
- Barker, J. H., & Weiss, J. P. (2019). Detecting lipopolysaccharide in the cytosol of mammalian cells: Lessons from MD-2/TLR4. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(1), 117–132. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1118-434R>
- Berghorn, K. A., Bonnett, J. H., & Hoffman, G. E. (1994). cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42(12), 1635–1642. <https://doi.org/10.1177/42.12.7983364>
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI*, 30(8), 453–459.
- Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>

- Besedovsky, L., Lange, T., & Born, J. (2012). Sleep and immune function. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 463(1), 121–137. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1044-0>
- Betancour, C., Cejudo-Bastante, M. J., Heredia, F., & Hurtado, N. (2016). Identificación de las betalainas del fruto del cactus (*Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw), estabilidad y actividad antioxidante de los extractos. *Congreso Iberoamericano de Productos Naturales*.
- Bhatia, S. (2015). Chapter 2 - Plant tissue culture. En S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Eds.), *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences* (pp. 31–107). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Chapter 8 - Plant-based biotechnological products with their production host, modes of delivery systems, and stability testing. En S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Eds.), *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences* (pp. 293–331). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00008-X>
- Bhatia, S., & Sharma, K. (2015). Chapter 14 - Plant tissue culture-based industries. En S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Eds.), *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences* (pp. 405–417). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00014-5>
- Bravo Hollis, H. (1978). *La cactáceas de México* (Vol. 1). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Brodbelt, A., & Stoodley, M. (2007). CSF pathways: a review. *British Journal of Neurosurgery*, 21(5). <https://doi.org/10.1080/02688690701447420>
- Burbridge, S., Stewart, I., & Placzek, M. (2016). Development of the neuroendocrine hypothalamus. En *Comprehensive Physiology*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150023>
- Butterworth, C., & Wallace, R. (2005). Molecular phylogenetics of the leafy cactus genus *Pereskia* (Cactaceae). *Systematic Botany*, 30, 800–808. <http://www.jstor.org/stable/25064111>
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the twenty-first century. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815, pp. 17–46). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2)
- Carpenter, T. S., Parkin, J., & Khalid, S. (2016). The free energy of small solute permeation through the *Escherichia coli* outer membrane has a distinctly asymmetric profile. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(17), 3446–3451. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01399>

- Carvalho, E. G., Soares, C. P., Blau, L., Menegon, R. F., & Joaquim, W. M. (2014). Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(6), 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.008>
- Cavaillon, J. M. (2018). Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon*, 149, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.016>
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>
- Cheng, X., Yang, Y. L., Yang, H., Wang, Y. H., & Du, G. H. (2018). Kaempferol alleviates LPS-induced neuroinflammation and BBB dysfunction in mice via inhibiting HMGB1 release and down-regulating TLR4/MyD88 pathway. *International Immunopharmacology*, 56, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.002>
- Chung, H. H., & Ouyang, H. Y. (2020). Use of thidiazuron for high-frequency callus induction and organogenesis of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plants*, 10(1), 67. <https://doi.org/10.3390/plants10010067>
- Cochet, F., & Peri, F. (2017). The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) signalling. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2318. <https://doi.org/10.3390/ijms18112318>
- Cruz, F. C., Javier, R. F., & Hope, B. T. (2015). Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Research*, 1628(Pt A), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.005>
- Cruz Mendoza, F., Jauregui Huerta, F., Aguilar Delgadillo, A., García Estrada, J., & Luquin, S. (2022). Immediate early gene c-fos in the brain: focus on glial cells. *Brain Sciences*, 12(6), 687. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060687>
- da Luz Costa, J., da Silva, A. L. L., Bier, M. C. J., Brondani, G. E., Gollo, A. L., Letti, L. A. J., Erasmo, E. A. L., & Soccol, C. R. (2015). Callus growth kinetics of physic nut (*Jatropha curcas* L.) and content of fatty acids from crude oil obtained *in vitro*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 892–902. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1618-y>
- Dar, S. A., Nawchoo, I. A., Tyub, S., & Kamili, A. N. (2021). Effect of plant growth regulators on *in vitro* induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. *Biotechnology Reports*, 32, e00688. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00688>

- Dávila Figueroa, C. A., de la Rosa Carrillo, M. de L., & Pérez Molphe Balch, E. (2005). *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(4), 540–545. <https://doi.org/10.1079/IVP2005668>
- de Aguiar Lage, D., da Silva Tirado, M., Vanicore, S. R., de Carvalho Sabino, K. C., & Albarello, N. (2015). Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(2), 341–350. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0771-x>
- de Castro Campos Pinto, N., do Nascimento Duque, A. P., Ramos Pacheco, N., de Freitas Mendes, R., da Silva Motta, E. V., Quaglio Bellozi, P. M., Ribeiro, A., Salvador, M. J., & Scio, E. (2015). *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1780–1785. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1008144>
- de Castro Campos Pinto, N., Machado, D. C., da Silva, J. M., Conegundes, J. L. M., Gualberto, A. C. M., Gameiro, J., Moreira Chedier, L., Castañón, M. C. M. N., & Scio, E. (2015). *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 173(15), 330–337. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2015.07.032>
- de Castro Campos Pinto, N., & Scio, E. (2014). The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae)-A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(3), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0423-z>
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. En E. Yahia & A. Carrillo-López (Eds.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253–271). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- Dillard, C. J., & German, J. B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744–1756. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W)
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139(2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants. *Molecules*, 25(10), 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>

- dos Santos Pereira, M., Guimarães, F. S., Del Bel, E., Raisman Vozari, R., & Michel, P. P. (2020). Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- $\kappa$ B-dependent signaling and glucose consumption. *Glia*, *68*(3), 561–573. <https://doi.org/10.1002/glia.23738>
- Egea, M. B., & Pierce, G. (2021). Bioactive compounds of barbados gooseberry (*Pereskia aculeata* Mill.). En H. N. Murthy & K. Y. Paek (Eds.), *Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes* (pp. 225–237). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57415-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57415-4_13)
- Figueira, I., Tavares, L., Jardim, C., Costa, I., Terrasso, A. P., Almeida, A. F., Govers, C., Mes, J. J., Gardner, R., Becker, J. D., McDougall, G. J., Stewart, D., Filipe, A., Kim, K. S., Brites, D., Brito, C., Brito, M. A., & Santos, C. N. (2019). Blood–brain barrier transport and neuroprotective potential of blackberry-digested polyphenols: an in vitro study. *European Journal of Nutrition*, *58*(1), 113–130. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1576-y>
- Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., & Bugajski, J. (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports*, *65*(6), 1655–1662. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71527-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71527-5)
- Gafner, S., & Bergeron, C. (2005). The challenges of chemical stability testing of herbal extracts in finished products using state-of-the-art analytical methodologies. *Current Pharmaceutical Analysis*, *1*(2), 203–215. <https://doi.org/10.2174/1573412054022734>
- Galvan, V. (2016). *Aclimatación de plantas in vitro de Pereskia sacharosa y análisis del perfil químico* [Tesis de pregrado]. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Gantait, S., & Mahanta, M. (2021). Picloram-induced enhanced callus-mediated regeneration, acclimatization, and genetic clonality assessment of gerbera. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00269-1>
- 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. C. F. R. (2019). Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. *Food Chemistry*, *294*(1), 302–308. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.05.074>
- Gavrilov, Yu. v., Perekrest, S. v., & Novikova, N. S. (2008). Intracellular expression of c-Fos protein in various structures of the hypothalamus in electrical pain stimulation and administration of antigens. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, *38*(1), 87–92. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-0012-4>

- Georgiev, M. I., Weber, J., & Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 809–823. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2049-x>
- Gholijani, N., Gharagozloo, M., Farjadian, S., & Amirghofran, Z. (2016). Modulatory effects of thymol and carvacrol on inflammatory transcription factors in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Journal of Immunotoxicology*, 13(2), 157–164. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2015.1029145>
- Goodman, T., & Hajihosseini, M. K. (2015). Hypothalamic tanycytes—masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00387>
- 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). Efecto analgésico, caracterización fitoquímica y análisis toxicológico del extracto etanólico de hojas de *Pereskia lychnidiflora*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(4), 581–589.
- Guilhon, C. C., Rahayu, I., Wahab, A., Boylan, F., & Fernandes, P. D. (2015). Central antinociceptive and mechanism of action of *Pereskia bleo* Kunth leaves crude extract, fractions and isolated compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 915927. <https://doi.org/10.1155/2015/915927>
- Guilhon, C., Wahab, I., Boylan, F., & Fernandes, P. (2012). Evaluation of antinociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. *Planta Medica*, 78(11). <https://doi.org/10.1055/s-0032-1320474>
- Hajdu, Z., & Hohmann, J. (2012). An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3), 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.029>
- Herrera, D., & Robertson, H. (1996). Activation of c-Fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50(2–3), 83–107. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00021-4)
- Hoogland, I. C. M., Houbolt, C., van Westerloo, D. J., van Gool, W. A., & van de Beek, D. (2015). Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *Journal of Neuroinflammation*, 12(114). <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>
- Hua, R., Ding, Y., Liu, X., Niu, B., Chen, X., Zhang, J., Liu, K., Yang, P., Zhu, X., Xue, J., & Wang, H. (2022). *Lonicerae japonicae* Flos extract promotes sleep in sleep-deprived and lipopolysaccharide-challenged mice. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.848588>

- Hudson, A. E. (2018). Genetic reporters of neuronal activity: c-fos and G-CaMP6. En *Methods in enzymology* (Vol. 603, pp. 197–220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.023>
- Huffman, W. J., Subramaniyan, S., Rodriguiz, R. M., Wetsel, W. C., Grill, W. M., & Terrando, N. (2019). Modulation of neuroinflammation and memory dysfunction using percutaneous vagus nerve stimulation in mice. *Brain Stimulation*, 12(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.10.005>
- Imran, M., Rauf, A., Khalil, A. A., Bawazeer, S., Patel, S., & Shah, Z. A. (2021). Anti-inflammatory properties of bioactive compounds from medicinal plants. En *Health Benefits of Secondary Phytocompounds from Plant and Marine Sources* (1st ed., pp. 81–108). Apple Academic Press.
- Irwin, M. R., & Opp, M. R. (2017). Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 129–155. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.148>
- Jaworski, J., Kalita, K., & Knapska, E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 78(4), 287–296. <https://doi.org/10.21307/ane-2018-027>
- Joo, J. Y., Schaukowitch, K., Farbiak, L., Kilaru, G., & Kim, T. K. (2016). Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nature Neuroscience*, 19(1), 75–83. <https://doi.org/10.1038/nn.4170>
- Kagan, J. C. (2017). Lipopolysaccharide detection across the kingdoms of life. *Trends in Immunology*, 38(10), 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.001>
- Karakas, F. P. (2020). Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of goji berry (*Lycium barbarum* L.) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.009>
- Kazama, C. C., Uchida, D. T., Canzi, K. N., de Souza, P., Crestani, S., Gasparotto Junior, A., & Laverde Junior, A. (2012). Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.034>
- Korf, H. W., & Møller, M. (2021). Arcuate nucleus, median eminence, and hypophysial pars tuberalis. *Handbook of Clinical Neurology*, 180, 227–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00015-X>

- Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4), 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0)
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
- Kumazawa, Y., Kawaguchi, K., & Takimoto, H. (2006). Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor. *Current Pharmaceutical Design*, 12(32), 4271–4279. <https://doi.org/10.2174/138161206778743565>
- Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, 1635(4), 461770. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461770>
- Leuenberger, B. E. (1986). *Pereskia* (Cactaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 14, 1–141.
- Li, J., Csakai, A., Jin, J., Zhang, F., & Yin, H. (2016). Therapeutic developments targeting toll-like receptor-4-mediated neuroinflammation. *ChemMedChem*, 11(2), 154–165. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500188>
- Li, W. H., Cheng, X., Yang, Y. L., Liu, M., Zhang, S. S., Wang, Y. H., & Du, G. H. (2019). Kaempferol attenuates neuroinflammation and blood brain barrier dysfunction to improve neurological deficits in cerebral ischemia/reperfusion rats. *Brain Research*, 1722(1), 146361. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146361>
- Li, Y., Saravana Kumar, P., qiu, J., Ran, Y., Tan, X., Zhao, R., Ai, L., Yuan, M., Zhu, J., & He, M. (2022). Production of bioactive compounds from callus of *Pueraria thomsonii* Benth with promising cytotoxic and antibacterial activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(6), 103854. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103854>
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. v, Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
- Lopes, P. C. (2016). LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology*, 24(5), 291–293. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0283-2>
- Loyola Vargas, V. M., & Ochoa Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. En V. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols*.

*Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)

Macías Martínez, D. D. (2017). *Establecimiento de cultivos de callos de Pereskia spp., su análisis fitoquímico y evaluación de actividad antioxidante* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Maciel, V. B. V., Bezerra, R. Q., Chagas, E. G. L. das, Yoshida, C. M. P., & Carvalho, R. A. de. (2021). Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.18020>

Maciel, V. B. V., Yoshida, C. M. P., & Goycoolea, F. M. (2019). Agronomic cultivation, chemical composition, functional activities and applications of *Pereskia* species – a mini review. *Current Medicinal Chemistry*, 26(24), 4573–4584. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180926151615>

Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>

Malek, S. N. A., Shin, S. K., Wahab, N. A., & Yaacob, H. (2008). Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. *Molecules*, 14(5), 1713–1724. <https://doi.org/10.3390/molecules14051713>

Mamad, O., Islam, M. N., Cunningham, C., & Tsanov, M. (2018). Differential response of hippocampal and prefrontal oscillations to systemic LPS application. *Brain Research*, 1681, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.036>

Mari Acevedo, J., Yelvington, K., & Tatum, W. O. (2019). Normal EEG variants. En *Handbook of clinical neurology* (Vol. 160, pp. 143–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00009-6>

Mauseth, J. D., & Landrum, J. v. (1997). Relictual vegetative anatomical characters in Cactaceae: the genus *Pereskia*. *Journal of Plant Research*, 110, 55–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02506843>

Moffatt, J. H., Harper, M., & Boyce, J. D. (2019). Mechanisms of polymyxin resistance. En J. Li, R. Nation, & K. Kaye (Eds.), *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1145, pp. 55–71). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5)

- Mohd Salleh, S. F., Ismail, N., Wan Ibrahim, W. S., & Tuan Ismail, T. N. N. (2020). Phytochemical screening and cytotoxic effects of crude extracts of *Pereskia Bleo* leaves. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 26(3), 291–302. <https://doi.org/10.1080/10496475.2020.1729287>
- 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 Chemistry*, 196(1), 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.041>
- Moradi, A., Zarinkamar, F., Caretto, S., & Azadi, P. (2018). Influence of thidiazuron on callus induction and crocin production in corm and style explants of *Crocus sativus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(11), 185. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2760-2>
- Müller Putz, G. R. (2020). Electroencephalography. En N. F. Ramsey & J. del R. Milan (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (3rd ed., Vol. 168, pp. 249–262). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63934-9.00018-4>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nava Catorce, M., & Gevorkian, G. (2016). LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Current Neuropharmacology*, 14(2), 155–164. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666151204122017>
- Neumann, K. H., & Jafargholi Imani, A. K. (2009). *Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Nikolaeva, T. N., Zagoskina, N. v., & Zaprometov, M. N. (2009). Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and NAA. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(1), 45–49. <https://doi.org/10.1134/S1021443709010075>
- Nurestri, A. M. S., Sim, K. S., & Norhanom, A. W. (2009). Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) leaves. *Journal of Biological Sciences*, 9(5), 488–493. <https://doi.org/10.3923/jbs.2009.488.493>

- Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. En G. Frankel & E. Ron (Eds.), *Escherichia coli, a Versatile Pathogen. Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 416, pp. 181–211). Springer. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_110](https://doi.org/10.1007/82_2018_110)
- Pan, Y., Li, L., Xiao, S., Chen, Z., Sarsaiya, S., Zhang, S., ShangGuan, Y., Liu, H., & Xu, D. (2020). Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. *PLOS ONE*, *15*(2), e0220084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220084>
- Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, *45*(12), e66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- Partap, M., Kumar, P., Kumar, P., Pal, P. K., Kumar, D., Warghat, A. R., & Kumar, S. (2022). Fruit derived callus and cell suspension culture as promising alternative sources for mogrosides production in *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey: a zero-caloric natural sweetener. *Journal of Food Composition and Analysis*, *108*, 104450. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104450>
- Peng, L., Zhu, M., Yang, Y., Weng, Y., Zou, W., Zhu, X., Guo, Q., & Zhong, T. (2019). Neonatal lipopolysaccharide challenge induces long-lasting spatial cognitive impairment and dysregulation of hippocampal histone acetylation in mice. *Neuroscience*, *398*(1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.001>
- Pérez Molphe Balch, E., & Dávila Figueroa, C. A. (2002). In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *38*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1079/IVP2001248>
- Pérez Molphe Balch, E., Pérez Reyes, M. E., Villalobos Amador, E., Meza Rangel, E., Morones Ruiz, L. del R., & Lizalde Viramontes, H. J. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *34*(2), 131–135. <https://doi.org/10.1007/BF02822777>
- Pérez Molphe Balch, E., Santos Díaz, M. del S., Ramírez Malagón, R., & Ochoa Alejo, N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*, *72*(6), 540–561. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012>
- Pérez Portero, Y., Vera Ayala, A., García Díaz, J., Escalona Arranz, J. C., & Casals Hung, M. (2021). Estabilidad físico-química del extracto hidroetanólico al 70% de hojas de *Spondias mombin* L. *Revista Cubana de Química*, *33*(3), 305–325.

- Peschel, A., & Sahl, H. G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 529–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
- 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. *Journal of Luminescence*, 194, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.10.024>
- Quan, N., Stern, E. L., Whiteside, M. B., & Herkenham, M. (1999). Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *Journal of Neuroimmunology*, 93(1–2), 72–80. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00193-3)
- Quan, N., Whiteside, M., & Herkenham, M. (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1 $\beta$  messenger rna expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*, 83(1), 281–293. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00350-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00350-3)
- Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 845–872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>
- Raetz, C. R. H., Guan, Z., Ingram, B. O., Six, D. A., Song, F., Wang, X., & Zhao, J. (2009). Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *Journal of Lipid Research*, 50, S103–S108. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800060-JLR200>
- Raetz, C. R. H., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 295–329. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rigillo, G., Vilella, A., Benatti, C., Schaeffer, L., Brunello, N., Blom, J. M. C., Zoli, M., & Tascetta, F. (2018). LPS-induced histone H3 phospho(Ser10)-acetylation(Lys14) regulates neuronal and microglial neuroinflammatory response. *Brain, Behavior, and Immunity*, 74, 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.019>
- Robledo Paz, A., Vázquez Sánchez, M. N., Adame Álvarez, R. M., & Estela Jofre Garfias, A. (2006). Callus and suspension culture induction, maintenance, and characterization. En V. M. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (Vol. 318, pp. 59–70). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:059>

- Rockstrom, M. D., Chen, L., Taishi, P., Nguyen, J. T., Gibbons, C. M., Veasey, S. C., & Krueger, J. M. (2018). Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews*, 40, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2017.10.005>
- Rodríguez Chanfrau, J. E., Fuentes, L., Pardo Ruiz, Z., & Garma, M. (2003). Estabilidad de extractos fluidos al 70% de *Cymbopogon citratus*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(2).
- Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, 34–45.
- Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.05.017>
- Ruiz Velasco Martínez, F., González Trujano, M. E., Cabañas García, E., Yáñez Recendis, N., Pérez Molphe Balch, E., Sánchez Jaramillo, E., & Gómez Aguirre, Y. A. (2022). Antinociceptive activity of *Pereskia sacharosa* Griseb. (Cactaceae) and localization of bioactive compounds in mice brain. *Phytomedicine Plus*, 2(4), 100331. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100331>
- Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6). <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>
- Santos Díaz, M. del S., Santos Díaz, Ma. de L., & Alvarado Rodríguez, J. (2022). *In vitro* regeneration of the endangered cactus *Turbincarpus mombergeri* (Riha), a hybrid of *T. laui* × *T. pseudopectinatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148(2), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02181-5>
- Saran, S., Prem, B., & Dantu, K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer.
- Scelsi, C. L., Rahim, T. A., Morris, J. A., Kramer, G. J., Gilbert, B. C., & Forseen, S. E. (2020). The lateral ventricles: a detailed review of anatomy, development, and anatomic variations. *American Journal of Neuroradiology*, 41(4). <https://doi.org/10.3174/ajnr.A6456>
- Schain, M., & Kreisl, W. C. (2017). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders—a review. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(3), 25. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0733-2>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 34, 6–17. <https://doi.org/10.1159/000360925>

- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127(7), 624–633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
- Silva Torres, T. M., Alvarez Rivera, G., Mazzutti, S., David Sánchez-Martínez, J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Regina, S., & Ferreira, S. (2021). Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 179, 105390. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105390>
- Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 403–416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>
- Soltani Zangbar, H., Ghadiri, T., Seyedi Vafaei, M., Ebrahimi Kalan, A., Fallahi, S., Ghorbani, M., & Shahabi, P. (2020). Theta oscillations through hippocampal/prefrontal pathway: importance in cognitive performances. *Brain Connectivity*, 10(4), 157–169. <https://doi.org/10.1089/brain.2019.0733>
- Somensí, N., Rabelo, T. K., Guimarães, A. G., Quintans-Junior, L. J., de Souza Araújo, A. A., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2019). Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*, 75, 105743. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105743>
- Souza, L. F., Caputo, L., Inchausti De Barros, I. B., Fratianni, F., Nazzaro, F., & De Feo, V. (2016). *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) leaves: chemical composition and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1478.
- Souza, L. F., de Barros, I. B. I., Mancini, E., Martino, L. De, Scandolera, E., & Feo, V. De. (2014). Chemical composition and biological activities of the essential oils from two *Pereskia* species grown in Brazil. *Natural Product Communications*, 9(12), 1805–1808. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400901237>
- Sperandeo, P., Martorana, A. M., & Polissi, A. (2019). Lipopolysaccharide biosynthesis and transport to the outer membrane of gram-negative bacteria. *Sub-cellular Biochemistry*, 92, 9–37. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_2)
- Stevenson, R. J., & Francis, H. M. (2017). The hippocampus and the regulation of human food intake. *Psychological Bulletin*, 143(10). <https://doi.org/10.1037/bul0000109>

- Stratchko, L., Filatova, I., Agarwal, A., & Kanekar, S. (2016). The ventricular system of the brain: anatomy and normal variations. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 37(2). <https://doi.org/10.1053/j.sult.2016.01.004>
- Subedi, L., Cho, K., Park, Y. U., Choi, H. J., & Kim, S. Y. (2019). Sulforaphane-enriched broccoli sprouts pretreated by pulsed electric fields reduces neuroinflammation and ameliorates scopolamine-induced amnesia in mouse brain through its antioxidant ability via Nrf2-HO-1 activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 3549274. <https://doi.org/10.1155/2019/3549274>
- Sultan, Z. W., Jaeckel, E. R., Krause, B. M., Grady, S. M., Murphy, C. A., Sanders, R. D., & Banks, M. I. (2021). Electrophysiological signatures of acute systemic lipopolysaccharide-induced inflammation: potential implications for delirium science. *British Journal of Anaesthesia*, 126(5), 996–1008. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.12.040>
- Sweeney, R. P., & Lowary, T. L. (2019). New insights into lipopolysaccharide assembly and export. *Current Opinion in Chemical Biology*, 53, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.07.004>
- Tan, M. L., Sulaiman, S. F., Najimuddin, N., Samian, M. R., & Muhammad, T. S. T. (2005). Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC.(Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of ethnopharmacology*, 96(1–2), 287–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.025>
- Tatu, L., & Vuillier, F. (2014). Structure and vascularization of the human hippocampus. *Frontiers of neurology and neuroscience*, 34, 18–25. <https://doi.org/10.1159/000356440>
- Wahab, S. I. A., Abdul, A. B., Mohan, S. M., Al-Zubairi, A. S., Elhassan, M. M., & Ibrahim, M. Y. (2008). Biological activities of *Pereskia bleo* extracts. *International Journal of Pharmacology*, 5(1), 71–75. <https://doi.org/10.3923/ijp.2009.71.75>
- Wanner, S. P., Yoshida, K., Kulchitsky, V. A., Ivanov, A. I., Kanosue, K., & Romanovsky, A. A. (2013). Lipopolysaccharide-induced neuronal activation in the paraventricular and dorsomedial hypothalamus depends on ambient temperature. *PLoS ONE*, 8(9), e75733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075733>
- Wei, Y., Chen, J., Hu, Y., Lu, W., Zhang, X., Wang, R., & Chu, K. (2018). Rosmarinic acid mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory responses through the inhibition of TLR4 and CD14 expression and NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation. *Inflammation*, 41(2), 732–740. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0728-9>

- Welcome, M. O. (2020). Neuroinflammation in CNS diseases: molecular mechanisms and the therapeutic potential of plant derived bioactive molecules. *PharmaNutrition*, 11, 100176. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100176>
- WFO. (2022). *Pereskia Mill.* Published on the Internet. <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000028718>.
- Wood, P. L. (2003). Microglia: roles of microglia in chronic neurodegenerative diseases. En P. L. Wood (Ed.), *Neuroinflammation: Mechanisms and Management* (2nd ed., pp. 3–28). Humana Press.
- Xia, Y., Yamagata, K., & Krukoff, T. L. (2006). Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS. *Brain Research*, 1095(1), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.112>
- Yang, Q., & Zhou, J. (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells. *Glia*, 67(6), 1017–1035. <https://doi.org/10.1002/glia.23571>
- Yen, C. T., & Lu, P. L. (2013). Thalamus and pain. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, 51(2). <https://doi.org/10.1016/j.aat.2013.06.011>
- Zareisedehizadeh, S., Tan, C. H., & Koh, H. L. (2014). A review of botanical characteristics, traditional usage, chemical components, pharmacological activities and safety of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 326107. <https://doi.org/10.1155/2014/326107>
- Zhang, J., Zheng, Y., Luo, Y., Du, Y., Zhang, X., & Fu, J. (2019). Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF-κB pathways in BV2 cells. *Molecular Immunology*, 116, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.020>

