



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE
HIBISCUS SABDARIFFA L EN TEJIDO NEURAL

PRESENTA

MCP LUIS FELIPE LEÓN AGUILAR

DIRECTORA DE TESIS

D. C. BERTHA FENTON NAVARRO

CO-DIRECTORA DE TESIS

D. C. LUZ TORNER AGUILAR

MORELIA MICHOACÁN, AGOSTO DEL 2011

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	4
II. INTRODUCCIÓN	6
1. INFLAMACIÓN	6
2. INFLAMACIÓN Y TEJIDO NEURAL	8
3. MODELOS DE NEUROINFLAMACIÓN	13
4. PLANTAS MEDICINALES	16
5. HIBISCUS SABDARIFFA L	18
6. LECTINAS	20
7. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LAS LECTINAS	24
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVO GENERAL	26

VI. OBJETIVOS PARTICULARES	27
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	27
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
IX. RESULTADOS	36
X. DISCUSIÓN	58
XI. CONCLUSIONES	68
XII. PERSPECTIVAS	69
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

I.- RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. Estas enfermedades (EN) se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales y de procesos inflamatorios, que provocan los trastornos asociados a cada enfermedad. En la farmacología se encuentra presente la búsqueda de nuevos principios activos que interfieran con los procesos neurodegenerativos. En esta búsqueda, se encuentra el uso de plantas medicinales que han sido empleadas tradicionalmente para tratar las EN y del SNC. En cuanto a los mecanismos de acción se sabe que estas plantas contienen metabolitos con actividad antioxidante y antiinflamatoria entre los que se encuentran: fenoles, flavonoides y esteroides, carbohidratos y proteínas (lectinas). Estas tienen la capacidad de modular la actividad de los mediadores de la inflamación. Objetivo: Analizar el efecto antiinflamatorio de extractos de *Hibiscus sabdariffa* L en un modelo de neuroinflamación inducida por lipopolisacárido (LPS). Material: Ratas macho Sprague Dawley (350 - 400gr), LPS. Metodología: Se administró 5 µg/µl de lipopolisacárido (LPS) intracerebroventricular (ICV) para generar neuroinflamación; y se monitoreó el peso diario posterior a la administración de LPS, la temperatura rectal a las 0, 2, 4, y 6 h y cada 24 h después de la aplicación de LPS; adicionalmente se determinaron la concentración de la citocina IL-1, 3 h posterior de la administración de LPS mediante ELISA. La conducta de locomoción se evaluó 1 h posterior al reto con LPS mediante la prueba de Campo Abierto. Los animales fueron sacrificados al día 7 posterior a la administración de LPS y se realizó un análisis microscópico del infiltrado celular mediante la tinción de hematoxilina y eosina en el hipocampo, zona periventricular y corteza cerebral. Los resultados obtenidos sugieren que *Hibiscus sabdariffa* L podía estar modulando y disminuyendo la neuroinflamación provocada por LPS.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Glicobiología de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas de la UMSNH y en el laboratorio de Neuroendocrinología del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS.

II.- INTRODUCCIÓN

1. INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso complejo que puede ser desencadenado por diversos factores que pueden ir desde contaminación ambiental hasta infecciones bacterianas y estímulos químicos, los cuales dan lugar a daño y muerte celular. El daño tisular provoca la liberación de mediadores de la inflamación, los cuales incluyen diversas citocinas, como la Interleucina 1 (IL-1), la Interleucina 6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) producidos por leucocitos, monocitos y macrófagos (Iwalewa E, 2007; Paterson H, 2003; O'Byrne K, 2001).

Estas citocinas pueden estimular la producción y activación de otras citocinas y quimiocinas, inmunoglobulinas, así como aumentar la expresión de las moléculas de adhesión celular (CAM) (Iwalewa E, 2007; Saklatvala J, 2003). Por otro lado, la fagocitosis de las bacterias o partículas extrañas se asocia con un aumento en el consumo de oxígeno por parte de los neutrófilos, en la que grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen, como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($HO \cdot$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Iwalewa E, 2007; Colin D, 2003). Así mismo, se observa un aumento en la expresión de fosfolipasa A2, lipoxigenasa-5 (5-LOX), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Iwalewa E, 2007; Okamoto T, 2004; Nakamura Y, 2003). Por su parte, las especies reactivas del oxígeno generan enzimas como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y la mieloperoxidasa. Además, se observa la activación del factor nuclear de transcripción kappa B (NF κ B). En última instancia, la activación de NF κ B desempeña un papel fundamental en la regulación de estas enzimas, citocinas inflamatorias, CAM, y otras sustancias que son responsables de desencadenar o potenciar el proceso inflamatorio (Iwalewa E, 2007).

La inflamación es una reacción local de protección celular y tisular por parte del organismo ante alérgenos químicos, lesiones e infecciones. Los

síntomas de la inflamación se caracterizan por la presencia de rubor, tumor, calor, dolor y pérdida de la función. Estos síntomas son resultado de la dilatación de los vasos sanguíneos, que conduce al aumento en el flujo de la sangre, y de las alteraciones en la estructura de la microvasculatura, reflejadas por un aumento en los espacios intercelulares, lo que permiten la extravasación y migración de leucocitos y proteínas plasmáticas hasta la zona de la lesión (Iwalewa E, 2007; Parham P, 2000).

Para comprender el proceso inflamatorio es fundamental entender el papel de los mediadores de la inflamación. Estos mediadores son las sustancias producidas y liberadas, como las citocinas y las proteínas plasmáticas, por células como los mastocitos, plaquetas, neutrófilos, monocitos y macrófagos ante el estímulo químico, traumático o infeccioso. Dichos mediadores, determinan la severidad de la inflamación, en función de la duración de la lesión, y son considerados factores proinflamatorios fundamentales. Estas sustancias se unen a receptores específicos de la membrana celular y desencadenan cascadas de señalizaciones que culminan con el aumento de la permeabilidad vascular, la quimiotaxis de neutrófilos, la estimulación de la contracción del músculo liso, el aumento de la actividad enzimática, además de provocar dolor y mediar el daño oxidativo. Algunos ejemplos de los mediadores de la inflamación son: el óxido nítrico (NO), las prostaglandinas (PG), leucotrienos (LK), aminas vasoactivas (histamina, serotonina) y citocinas (IL-1, IL6, TNF- α) (Tabla 1) (Iwalewa E, 2007; Coleman J, 2002).

La inflamación puede ser dividida en inflamación aguda y crónica. La inflamación aguda es la respuesta inmediata que se produce frente al agente lesivo (bacterias, virus, parásitos) y suele ser de corta duración. Esta respuesta se caracteriza por la exudación de proteínas plasmáticas y la migración de los leucocitos, especialmente neutrófilos, hasta la zona de la lesión. La inflamación crónica es de mayor duración y se caracteriza histológicamente por la presencia de linfocitos y macrófagos, dando lugar a fibrosis y necrosis de los tejidos, además de la proliferación de vasos

sanguíneos. Esta condición favorece el desarrollo de diversas enfermedades degenerativas como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la insuficiencia cardiaca congestiva, la diabetes mellitas, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, entre otras tantas (Iwalewa E, 2007; Dalgleish A, 2002).

Tabla 1. Acciones de los Mediadores de la Inflamación.

Acciones de los Mediadores de la Inflamación	
Vasodilatación Prostaglandinas Óxido nítrico	↑ Permeabilidad Vascular Aminas vasoactivas C3a y C5a Leucotrienos PAF Sustancia P
Quimiotaxis, Activación de Leucocitos C5a Leucotrieno B4 Quimioquinas Productos bacterianos	Lesión tisular Enzimas lisosomales Metabolitos del oxígeno Óxido nítrico
Dolor Prostaglandinas Bradicinina	Fiebre IL-1, IL-6, TNF Prostaglandinas

(Iwalewa E, 2007; Okamoto T, 2004; Colin D, 2003; Nakamura Y, 2003; Paterson H, 2003; Saklatvala J, 2003; Coleman J, 2002; O'Byrne K, 2001).

A esta enfermedades se le ha vinculado a una mayor expresión de mediadores proinflamatorios, debido a la activación de NFκB, como IL-1, IL-6, TNF-α, NADPH oxidasa, fosfolipasa A2, COX1 y -2, LOX-5, mieloperoxidasa, iNOS, los cuales pueden conducir a ciertas enfermedades degenerativas (Iwalewa E, 2007).

2. INFLAMACIÓN Y TEJIDO NEURAL

La inflamación crónica y persistente favorece el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (EN).

Las EN son enfermedades crónicas y progresivas que se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales y de procesos inflamatorios, que provocan los trastornos asociados a cada enfermedad. Las EN constituyen un problema de salud pública a nivel mundial y representan un grupo de padecimientos con importantes repercusiones sociales y económicas. Es evidente el alto costo económico relacionado con los medicamentos, los cuidados y la atención médica a largo plazo, así como el fuerte impacto que causan en las familias (Citron M, 2010; Corona T, 2002).

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas destacan la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la Esclerosis Múltiple (EM) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Jordan J, 2003; Segura T, 2003). El mayor factor de riesgo para desarrollar las enfermedades neurodegenerativas es la edad avanzada. De esta manera, se sabe que la prevalencia de estas enfermedades aumenta conforme incrementa la edad (Citron M, 2010; Aarli J, 2006, Chiappelli, 2006). Más de 25 millones de personas en el mundo padecen estas enfermedades. Hoy en día, en los Estados Unidos de Norteamérica, 5.3 millones de personas padecen la enfermedad de Alzheimer; 1 millón de Parkinson; 400.000 de Esclerosis Múltiple; 30.000 de Esclerosis Lateral Amiotrófica, y 30.000 de la Enfermedad de Huntington (Tabla 2) (Citron M, 2010; Harvard, 2009; Tweedie, 2009; Aarli J, 2006).

El impacto socioeconómico mundial de las EN es enorme, pero difícil de cuantificar con exactitud. El costo mundial total anual ha sido estimado y excede los \$200 billones de dólares. Tan solo el costo total anual de la EA en los Estados Unidos de Norteamérica se estima que es de \$148 billones de dólares (Citron M, 2010; Chiappelli F, 2006).

El panorama en México no deja de ser preocupante teniendo en cuenta la pobreza de nuestra población y la perspectiva de que las tasas de demencia aumenten a medida que se incremente la proporción de ancianos. Nuestro país

registra un rápido avance de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, México no cuenta con datos exactos acerca de su prevalencia. El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ha realizado estimaciones acerca de la prevalencia de estas enfermedades, las cuales concuerdan con las cifras que se manejan a nivel mundial, de esta manera, la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer, pudiera ser del 5 -10 % en personas de 60 a 65 años; y del 40 - 50 % en quienes están entre los 80 y 90 años (Corona T, 2002).

Tabla 2. Enfermedades Neurodegenerativas: Prevalencia, manifestaciones clínicas y fisiopatológicas.

Enfermedad	Prevalencia (US)	Pérdida Neuronal	Manifestaciones Clínicas	Inflamación
Enfermedad de Alzheimer (EA)	5 millones	+	↓ Memoria y lenguaje.	+
Enfermedad de Parkinson (EP)	1 millón	+	↓ Capacidades intelectuales. Movimientos involuntarios irregulares en extremidades.	+
Esclerosis Múltiple (EM)	400.000	+	Debilidad, inestabilidad de extremidades. Parestesia espástica.	
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	30.000	+	Parálisis de los músculos del habla, la deglución y la respiración .	
Enfermedad de Huntington (EH)	30.000	+	Movimientos irregulares involuntarios de los músculos de la cara.	

La + representa la presencia de la característica correspondiente en la tabla (Min S, 2009; Harvard, 2009; Tweedie, 2009; Aarli J, 2006; Griffin W, 2006; Chiappelli F, 2006; Dos Santo L, 2006; Joshi H, 2006; Jordan J, 2003).

De manera particular, en la EA se ha observado una depleción en neuronas colinérgicas del hipocampo, amígdala y corteza. Esta pérdida neuronal progresiva se refleja en la aparición de disfunciones tales como alteraciones en los procesos de memoria y lenguaje, alteraciones de la personalidad y cambios conductuales (McNaull B, 2009; Min S, 2009; Tweedie

D, 2009; Chiappelli F, 2006; Dos Santo L, 2006; Griffin W, 2006; Joshi H, 2006; Jordan J, 2003; Segura T, 2003). La pérdida cognitiva e intelectual asociadas a la EA está acompañada de cambios estructurales en el tejido neural, los cuales incluyen la formación placas seniles compuestas de depósitos de β -amilode y marañas neurofibrilares constituidas por la acumulación anormal de la proteína tau (τ), lesiones características de esta enfermedad. Estos cambios son los responsables directos del daño neural y de la pérdida progresiva de la capacidad de razonar, recordar, imaginar o aprender; de la demencia que caracteriza clínicamente a la EA, la cual a su vez, es la responsable de que estos pacientes requieran de cuidados y atención médica a largo plazo. La formación de estas placas y redes está asociada a procesos inflamatorios (Citron M, 2010; McNaull B, 2009; Chiappelli F, 2006; Griffin W, 2006; Jordan J, 2003; Segura T, 2003; Peinado M, 2000).

Por su parte, en la EP se observa una depleción de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y ganglios basales. Esta EN se caracteriza por la presencia de síntomas motores que incluyen temblor fino, rigidez y bradicinesia, así como una disminución en la expresión facial (McClain J, 2009; Jordan J, 2003; Corona T, 2002).

En cuanto a la ELA, la disminución observada es en la población de motoneuronas, lo cual da lugar a debilidad progresiva y a la parálisis de los músculos que intervienen en la movilidad, el habla, la deglución y la respiración (Jordan J, 2003; Segura T).

La neuroinflamación debida a la sobreexpresión de mediadores de la inflamación está asociada a diversas alteraciones de la conducta. En la EA, el incremento en la expresión de interleucina 1(IL-1) está directamente relacionada con la formación y progresión de las placas neuríticas y con una sobreexpresión de acetilcolinesterasa en el tejido neural. Más aún, la sobreexpresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) y de la interleucina 6 (IL-6) estimulan la producción de β -amilode, lo cual es crucial en la neurodegeneración en la EA. Por lo anterior podemos afirmar que

la neuroinflamación juega un papel primordial en la patogénesis y progresión de la EA. Dicha neuroinflamación se caracteriza por la presencia de células activadas de la microglía (Min S, 2009; Tweedie D, 2009; Griffin W, 2006). Las células gliales median la respuesta inmune innata en el Sistema Nervioso Central (SNC). Cuando se activan, los astrocitos y la microglía producen diversas moléculas proinflamatorias, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, moléculas del sistema del complemento y moléculas de adhesión. De particular interés en la EA son la citosina S100 β , la cual es producida principalmente por astrocitos, y la interleucina 1 (IL-1), la cual es producida por la activación de la microglía (Tweedie D, 2009; Iwalewa E, 2007; Griffin W, 2006).

La IL-1 juega un papel central en la patogénesis de la EA y sobre la cascada de eventos que caracterizan los procesos inflamatorios implicados en esta EN. La neuropatología de la EA incluye la formación de placas amiloides, degeneración neurofibrilar, alteración y pérdida sináptica y neuronal, disminución en la concentración de neurotransmisores, y activación de células gliales con expresión de citocinas proinflamatorias. La IL-1 regula aspectos moleculares de cada uno de estos eventos: expresión y procesamiento de la Proteína Precursora β -amilode (β -APP) en neuronas, lo cual favorece la formación y desarrollo de las placas amiloides; la fosforilación de τ (tau), lo cual favorece la degeneración neurofibrilar; aumenta la producción y actividad de acetilcolinesterasa (AChE), la enzima responsable de hidrolizar la acetilcolina, un importante neurotransmisor en el aprendizaje y la memoria; disminución de la producción de la sinaptofisina y aumento en la producción de Oxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), la cual favorece la muerte celular; y la activación de astrocitos con sobreexpresión de S100 β , la cual causa el desarrollo de neuritis e incrementa el flujo de calcio (un acontecimiento mortal) en las neuronas.

Cada uno de estos procesos regulados por la IL-1 resulta en estrés celular y daño neuronal, lo cual alternadamente potencia la activación y sobreexpresión de más IL-1. El resultado es un ciclo autopropagado, un círculo

vicioso de sobre expresión de IL-1, estrés neuronal, disfunción y muerte (Figura 1) (Tweedie D, 2009; Iwalewa E, 2007; Griffin W, 2006).

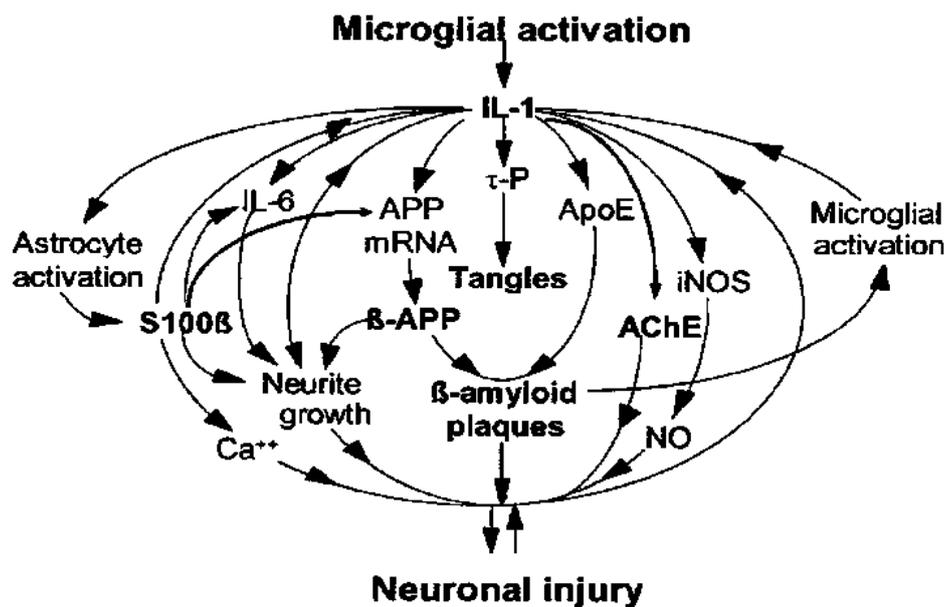


Figura 1. El papel de la Interleucina 1 (IL-1) en la EA. La IL-1 juega un papel central en la patogénesis de la EA y sobre la cascada de eventos que caracterizan los procesos inflamatorios implicados en esta EN los cuales resultan en estrés o daño neuronal (Tweedie D, 2009; Iwalewa E, 2007; Griffin W, 2006).

3. MODELOS DE NEUROINFLAMACIÓN

La aplicación de lipopolisacárido (LPS) para desencadenar una respuesta inmune se encuentra ampliamente reportada en la literatura, tanto en modelos in vitro como in vivo (McClain J, 2009; Min S, 2009; Sumi N, 2009; Tweedie D, 2009; Jang S, 2008; Huang Y, 2008; Yin W, 2007; Chun S, 2006; Felts P, 2005; Rosi S, 2005). Las vías de administración más utilizadas en los modelos in vivo son la intra peritoneal, intraespinal, o las aplicaciones directas en sustancia nigra y cuarto ventrículo (McClain J, 2009; Min S, 2009; Felts P, 2005; Rosi S, 2005).

El LPS es un polímero de ácidos grasos y polisacáridos presente en la capa externa de bacterias Gram (-) y es el responsable de desencadenar la respuesta inmune. El LPS estimula la producción central y periférica de diversas mediadoras de la inflamación, principalmente IL-1, IL-6 y TNF- α , reproduciendo de esta manera un modelo de neuroinflamación inducida (McClain J, 2009; Sumi N, 2009; Iwalewa E, 2007).

La aplicación de LPS provoca una respuesta de postración caracterizada por cambios conductuales, disminución en la ingesta de alimentos y aumento de la temperatura corporal. Esta respuesta es atribuida a la producción y efecto de las citocinas proinflamatorias (Huang Y, 2008; Dantzer R, 2007; Kelley K, 2003).

El LPS se une de manera específica al receptor transmembranal tipo Toll 4 (TLR4), presente en las células inmunes, mediante la formación del complejo LPS-proteína de unión a LPS (LPS-LBP). Esta unión produce una cascada de señalización en macrófagos y otras células inmunológicas que conducen a la activación del factor nuclear kappa B (NF κ B), con la consecuente producción de citocinas proinflamatorias (Bartfai T, 2010; Blatteis C, 2005; Boulant J, 2000).

NF- κ B regula distintas funciones celulares como la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune, así como el crecimiento y desarrollo celular. En el caso de la respuesta inflamatoria, el incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias induce la activación de NF- κ B bajo un mecanismo autocrino o paracrino (Bartfai T, 2010; Iwalewa E, 2007; Blatteis C, 2005; Boulant J, 2000).

Normalmente NF- κ B se encuentra en el citoplasma celular de manera inactiva, formando un complejo con la proteína inhibidora I κ B, lo cual evita que NF- κ B se trasloque al núcleo y se transcriban genes relacionados a la respuesta inflamatoria. Sin embargo, cuando se administra LPS, NF- κ B se activa mediante la fosforilación de la proteína I κ B, la cual es degradada y posteriormente NF- κ B se trasloca al núcleo y se une al ADN, activando de esta

manera la transcripción de genes, incluyendo citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión, fosfolípidos A2, lipoxigenasa, COX-2, iNOS, y mieloperoxidasa (Figura 2) (Iwalewa E, 2007).

La activación anormal de la vía NF- κ B está presente en las diferentes enfermedades neurodegenerativas (Iwalewa E, 2007).

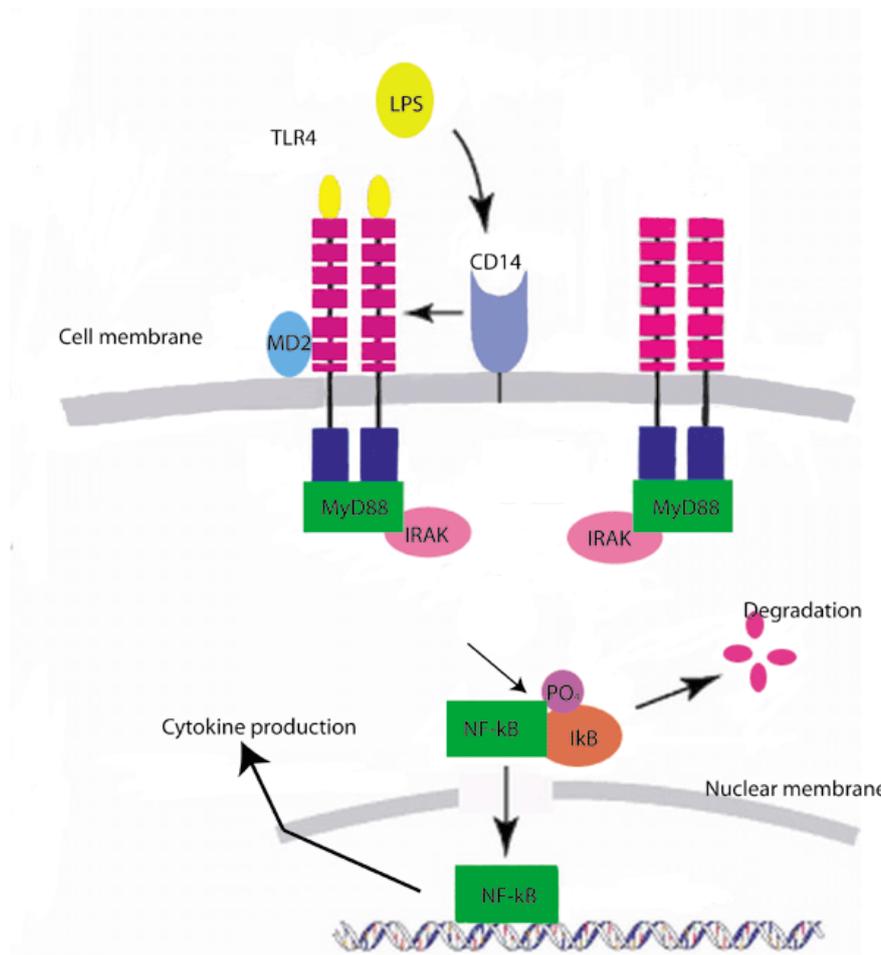


Figura 2. Vía de activación de NF- κ B.Diversos estímulos pueden provocar la fosforilación de I κ B, el cual se degrada y el NF- κ B asociado con este complejo es liberado y traslocado al núcleo, en donde se une a regiones promotoras de genes para modular su expresión (Iwalewa E, 2007).

4. PLANTAS MEDICINALES

En la farmacología se encuentra presente la búsqueda de nuevos principios activos que interfieran con los procesos neurodegenerativos enfocándose en prevenir, retardar o paliar la aparición de síntomas, así como también se avoca al estudio de los procesos de muerte neuronal y a la búsqueda de fármacos que modulen las rutas moleculares y celulares implicadas en estos procesos (Jordan J, 2003; Segura T, 2003). Desde la antigüedad hasta nuestros días, numerosas plantas medicinales se han empleado tradicionalmente para tratar las EN y del SNC. Algunos ejemplos de ellas son: *Acacia sieberiana*, *Sclerocarya birrea*, *Cyrtanthus suaveolens*, *Gethyllis ciliaris*, *Heteromorpha trifoliata*, *Ginkgo biloba*, *Withania somnifera*, *Semicarpus anacardium*, *Vitis vinifera*, *Gmeliana arborea*, *Cymbopogon citraus*, *Curcuma zedoary*, *Indigofera tinctoria*, *Dysoxylum binectariferum*, *Salvia officinalis*, *Oroxylum indicum*, *Hypericum perforatum L*, *Hibiscus sabdariffa L*, entre otras (Aggarwal B, 2006; Borrás, 2001; Mans D, 2000; Dos Santos L, 2006; Joshi H, 2006; Chiappelli F, 2006; Seo T, 2009).

En cuanto a los mecanismos de acción se sabe que estas plantas contienen metabolitos con actividad antioxidante y antiinflamatoria entre los que se encuentran: fenoles, flavonoides y esteroides, carbohidratos y proteínas (lectinas) (Tabla 3) (Fernández F, 2003; Dos Santos L, 2006; Saad B, 2006).

Los fenoles pueden reducir la formación de importantes mediadores de la inflamación ya que inhiben a la cicloxigenasa 1 (Cox-1) y a la cicloxigenasa 2 (Cox-2), inhiben la 5-lipoxigenasa (5-LOX) y la formación de óxido nítrico (NO). Los fenoles además pueden tener efecto analgésico debido a que muchos de estos compuestos pueden inhibir la síntesis de prostaglandinas. Dentro de las estructuras más representativas están: pirogalol, eugenol y los ácidos cafeico, cumárico, ferúlico, clorogénico, iríngico, vainillínico, gentísico y protoocatequínico (Fernández F, 2003).

En cuanto a los flavonoides se sabe que existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5,000 compuestos, 10 de ellos presentan un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difencil-propano) derivado del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato. Esta estructura química es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además pueden inhibir a las oxidasas y aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes y, al mismo tiempo son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Gran parte del estudio de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las plantas medicinales se han centrado en los flavonoides. Ejemplos de estos compuestos son: quercetina, genisteína, apigenina, kanferol, biochanina, formononetina, luteolina, hipolaetina, delfinidina, miricetina, rutina, miricetina 1 ramnosido, astilbina, hispidulina, escutellareina (Fernández F, 2003; Pérez G, 2003).

Los esteroides, por su parte, incrementan la producción de corticoesteroides y retardan su degradación. Los más abundantes son β sitosterol, estigmasterol y campesterol (Fernández F, 2003).

Tabla 3. Composición Química de los Metabolitos de las Plantas Medicinales.

Metabolitos con actividad antioxidante y antiinflamatoria				
Fenoles	Flavonoides	Esteroides	Carbohidratos	Proteínas (Lectinas)

(Fernández F, 2003; Dos Santos L, 2006; Saad B, 2006).

5. HIBISCUS SABDARIFFA L

Hibiscus sabdariffa L (jamaica) es un arbusto anual nativo de África e intensamente cultivado en las regiones tropicales y subtropicales de la India, Tailandia, Senegal, Egipto, Estados Unidos, Panamá y México. La planta de jamaica mide aproximadamente 2.5 metros de altura; su tallo es rojo, cilíndrico, liso y suave. Sus hojas son verdes y se observan en ellas venas de color rojo que pueden ser largas o cortas, crecen de manera alterna y miden de 7.5 a 12.5 centímetros de longitud. Las hojas de la parte baja pueden contener de tres a siete lóbulos con márgenes dentados. Las flores aparecen individualmente en las axilas de las hojas y miden aproximadamente 12.5 centímetros de ancho; son amarillas, con un centro de color rosa a marrón, y cambian a rosado al final del día, cuando se marchitan. El cáliz, de 3.2 a 5.7 centímetros de longitud, es típicamente rojo y consiste de cinco largos sépalos con un collar (épicaliz) y de ocho a doce hojas delgadas de 3.2 a 5.7 centímetros dispuestas alrededor de la base. La cápsula es verde cuando está inmadura y tiene cinco válvulas. Cada válvula contiene de tres a cuatro semillas afelpadas de color ligeramente café y en forma de riñón que miden de 3 a 5 milímetros de longitud.

El análisis fitoquímico de la jamaica ha revelado la presencia de fitosteroles, además de flavonoides, saponinas y otros glucósidos, además de carbohidratos, ácido ascórbico y una mezcla de ácido cítrico y málico. La jamaica contiene dos pigmentos coloridos: la hibiscina y la gopitina, que se usan como base natural de jarabes y licores coloridos. Se han identificado los pigmentos extraídos de las flores, como la hibiscina, gopitina, quercetina, mirecetina, hibiscetina, hibiscetrina y sabedaretina. Los principales pigmentos de esta planta son las antocianinas: la cianidina-3-glucósido y la delfinidina-3-glucósido, que tienen propiedades antioxidantes y que no presentan actividad tóxica ni mutagénica. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos (como el ácido procatecuíco) tienen fuertes propiedades antioxidantes, mientras que el ácido hibisco manifiesta una elevada actividad inhibitoria sobre ciertas enzimas pancreáticas (Essa M, 2007; Carvajal O, 2006; Joshi H, 2006). Además de

estos compuestos, se ha aislado la lectina de jamaica (HSL), la cual tiene un peso molecular (PM) de 32,500 D, un punto isoeléctrico (pI) de 6.85, es termoestable de 4 a 80°C y en un intervalo de pH de 6 a 8. Presenta especificidad para carbohidratos Gal>GalNac>Glu>GluNac>Lac>Rib>Fuc>Man>Sac>Xyl, independientemente de iones divalentes (Martínez J y Fenton B, 2008).

Los extractos de las flores de jamaica se emplean como colorantes naturales para los alimentos, en emulsiones para las bebidas y en la preparación de mermeladas y gelatinas de color rojo brillante y placentero con un sabor ácido. Las semillas constituyen una fuente excelente de aceite de cocina. Los tallos tiernos, hojas y cálices se usan en la preparación de sopas y salsas. Los cálices se ocupan en preparados que se consumen como sustitutos de la carne. La cocción de las flores también se usa como un sustituto del té o el café por personas que sufren de problemas de salud.

En la medicina tradicional, debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, se ha empleado en la terapia de enfermedades cardíacas, como la hipertensión arterial sistémica; en enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer y la depresión; en enfermedades hepáticas; además de su uso como antipirético (Essa M, 2007; Carvajal O, 2006; Joshi H, 2006).

Existe evidencia científica de las acciones farmacológicas que presenta *Hibiscus sabdariffa* L, tales como antiinflamatorio, anti-amnésico, antioxidante, antihipertensivo, diurético, antipirético, anti-hiperamonémico, además de exhibir un efecto nootrópico. El mecanismo de acción de sus flavonoides es el secuestro de radicales libres (RL) y la inhibición de enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por otro lado, el mecanismo de acción antiinflamatorio de las lectinas presentes en la jamaica es mediante la modulación de la migración de neutrófilos y monocitos además de inhibir la acción de la enzima acetilcolinesterasa y de esta manera modular las concentraciones de acetilcolina (Essa M, 2007; Joshi H, 2006).

En nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto antipirético de la jamaica en un modelo de pirexia inducida en ratas. La jamaica fue administrada por vía oral y la pirexia fue inducida por levadura de cerveza. Los resultados sugieren que tanto el extracto crudo, la fracción proteica rica en lectinas y los pigmentos presentan una actividad antipirética, probablemente vía IL-6 (Velázquez M y Fenton N, 2010).

6. LECTINAS

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos de la superficie celular, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas (Figura 3) (Assreuy A, 1997; Castillo A, 2005; Galleg del Sol F, 2006; Sharon N, 2004; Sharon, 2006).

En 1888, Hermann Stillmark describió la existencia, en extractos de semilla de ricino (*Ricinos communis*), de una proteína que aglutinaba eritrocitos. Se trataba de la ricina. Este hallazgo representó un hito para la biología. Demostraba que la toxicidad de las semillas se debía a la presencia de un factor proteico aglutinante de eritrocitos. Más tarde se describieron proteínas similares en semillas y cortezas de otras euforbiáceas (Sharon N, 2007; Galleg del Sol F, 2006; Castillo A, 2005).

M. Elfstand introdujo, en 1898, el término hemaglutininas para designar a este grupo de proteínas hemaglutinantes. James B. Summer, en 1919, establecieron que la hemaglutinación causada por la Concanavalina A (Con A), aislada de la semilla de *Canavaliaensiformes*, podía inhibirse mediante sacarosa. El hallazgo evidenció que la hemaglutinación resultaba de la unión específica de Con A con azúcares de la superficie de eritrocitos vecinos, poniendo de manifiesto la especificidad de las lectinas a los carbohidratos (Sharon N, 2007; Gallego del Sol F, 2006; Castillo A, 2005).

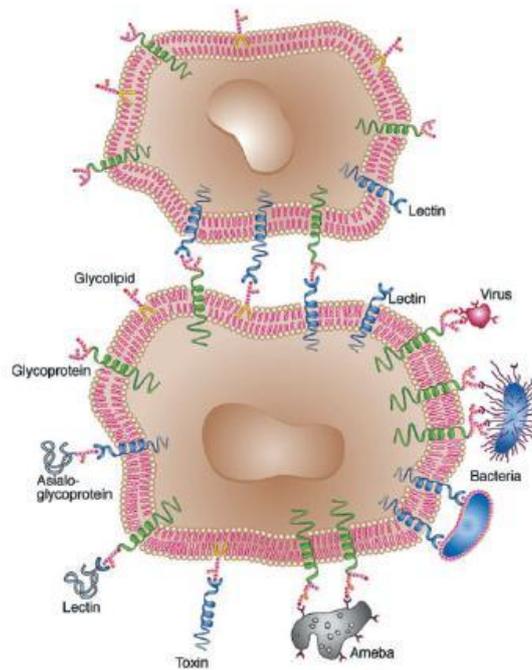


Figura 3. Interacciones lectina-carbohidratos en la superficie celular. Las lectinas sirven como medio de unión de diferentes tipos celulares. En algunos casos, las lectinas se unen a glicoproteínas particulares de la superficie celular, en otros casos, las glicoproteínas de la superficie celular sirven como sitios de unión de moléculas biológicamente activas (N Sharon, 2004).

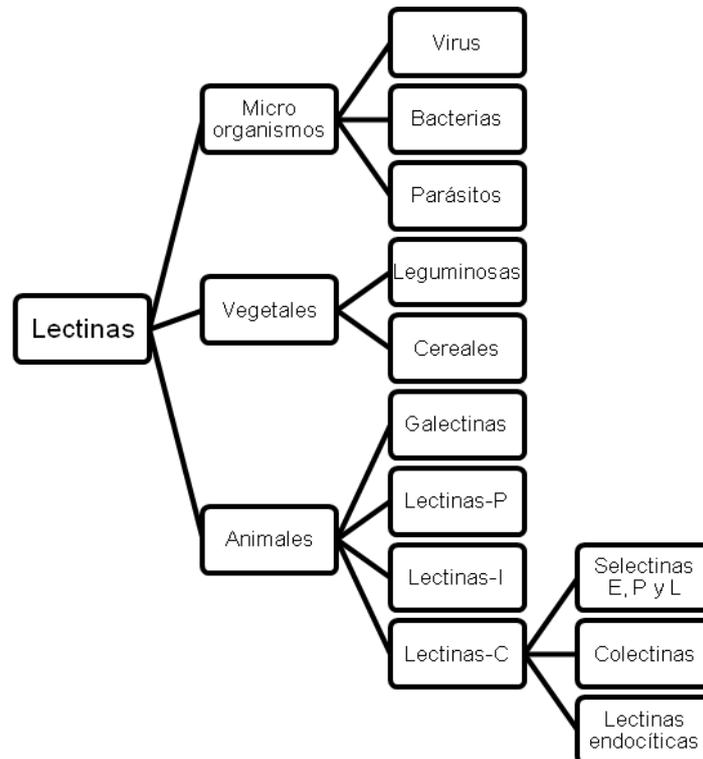
Desde los años cincuenta hasta nuestros días, se han venido identificando cientos de lectinas distribuidas en la naturaleza, en diferentes organismos como virus, microorganismos, hongos, animales y plantas (Tabla 4). Estas proteínas presentan, entre otros caracteres comunes, un dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) (Sharon N, 2007; Gallego del Sol F, 2006; Castillo A, 2005).

En las plantas, la mayoría de estas moléculas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen de 2 a 10% del total de proteína de éstas. Se sugiere que dentro de la planta, estas proteínas pueden tener diferentes funciones como son: regulación fisiológica, defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica, reconocimiento de las

bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, y algunas más (Sharon N, 2007; Gallego del Sol F, 2006; Castillo A, 2005).

Se sabe que las lectinas del cacahuete (PNA) y las del germen del trigo (WGA) son transportadas por transcitosis y son absorbidas por los enterocitos y las células M en el intestino humano. Así mismo, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por transcitosis vía caveolas. Las caveolas transportan de manera selectiva proteínas desde el lado luminal de las células endoteliales hacia el compartimento intersticial para la posterior absorción de los tejidos subyacentes (Figura 4) (Gullberg E, 2005; Tuma P, 2003).

Tabla 4. Clasificación de las Lectinas de acuerdo a su Origen.



(Sharon N, 2007; Gallego del Sol F, 2006; Castillo A, 2005)

Diferentes procesos biológicos requieren del reconocimiento de carbohidratos como la adhesión y reconocimiento celular, regulación del crecimiento celular, inflamación, inmunomodulación, apoptosis y metástasis. De esta manera las lectinas están involucradas en diversos procesos tanto

fisiológicos como fisiopatológicos (Sharon, 2007; Gallego del Sol F, 2006; Sharon N, 2004; Gabius H, 2001; Rabinovich G, 1999).

Las lectinas presentes en el SNC son las lectinas tipo C como siglec, galectinas y sialoadhesinas, además de las moléculas asociadas a mielina tales como nogo, glicoproteína asociada a mielina (MAG), glicoproteína oligodendrocítica de mielina (OMgp), proteína mielínica de la célula de Schwann (SMP), semaforina 4D (Sema4D/CD) y proteoglicano de condroitin sulfato (CSPG), entre otras (Seo T, 2009; Collins B, 1999; Mcintyre L, 1997).

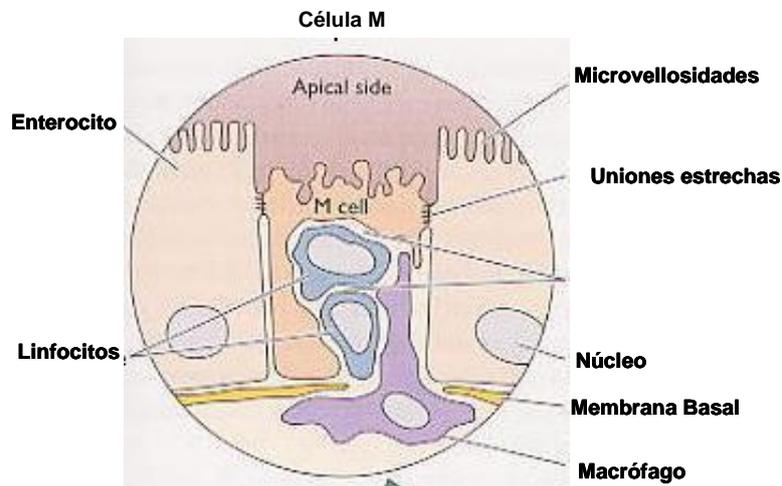


Figura 4. Transcitosis en células M. Células M con linfocitos residentes en el espacio intraepitelial, rodeadas de enterocitos absortivos. (Tuma P, 2003).

Las funciones en las que están implicadas las lectinas en el SNC son diversas y comprenden la modulación de la morfología y crecimiento neural; regeneración axonal; marcaje celular tales como microglía en tallo cerebral y otras estructuras del SNC; marcaje de las vías neuronales que siguen las diferentes sustancias que son administradas en el SNC y el tipo celular que las absorbe; además de participar en la modulación de los procesos inflamatorios (Fendrick S, 2007; Cheunsuang O, 2006; Kalovidouris S, 2005; Saganová K, 2004).

7. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LAS LECTINAS

Diversos estudios se han realizado para estudiar los mecanismos de acción de las lectinas en los procesos inflamatorios. Una de las vías en las que las lectinas modulan estos procesos es mediante la inhibición de la migración de neutrófilos por parte de lectinas específicas a glucosa-manosa.

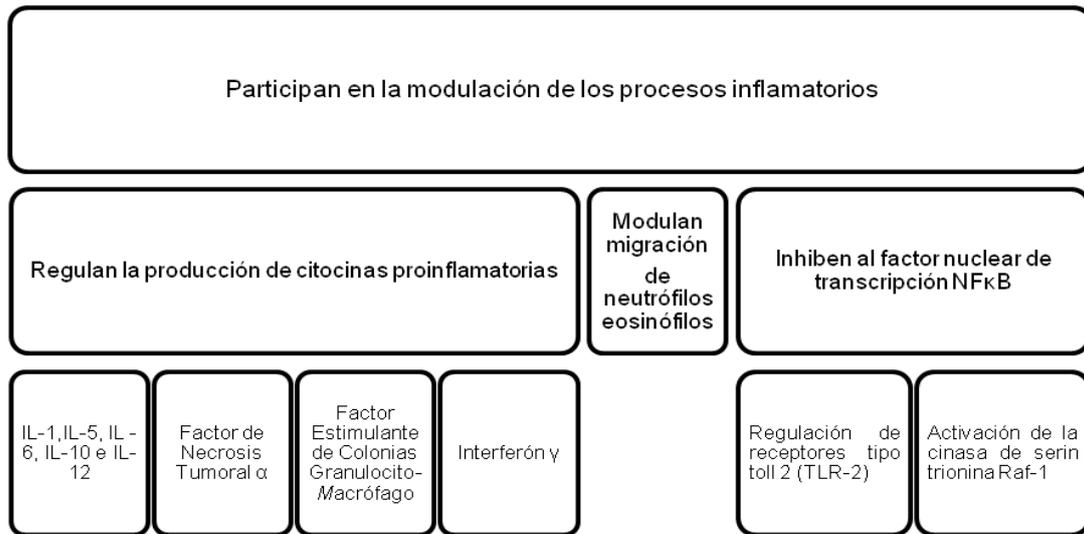
Esta actividad antiinflamatoria implica una competencia entre las lectinas y las selectinas por un ligando-carbohidrato común presente en los leucocitos y/o en las membranas de las células endoteliales (Assreuy A, 1997). Lectinas tipo C-galactosa específicas (MGL/CD301) inducen la producción de Interleucina 10 (IL-10) por parte de macrófagos ante la invasión bacteriana (Saba K, 2009). Se ha estudiado a las galectinas y su función como moduladoras de la respuesta inmune innata así como su papel en la migración de eosinófilos durante los procesos inflamatorios (Rabinovich G, 1999). Otros estudios han demostrado que lectinas de muérdago galactosa-específica tiene propiedades inmunomoduladoras, lo cual se refleja por una regulación en la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente interleucina-1, -6, -10 y -12, factor de necrosis tumoral α y factor estimulante de colonias granulocito-macrófago. Así mismo, se ha demostrado que la galectina-1 reduce los niveles de interferón γ y claramente incrementa la producción de IL-5, además de poseer actividad pro-apoptótica. Por su parte, la galectina-3 reduce la producción de IL-5 y muestra resistencia a la apoptosis (Gabiús H, 2001).

Más aún, se sabe que las lectinas a nivel molecular inhiben al factor nuclear de transcripción NF κ B mediante dos vías diferentes: 1) vía regulación de receptores tipo toll 2 (TLR-2), y2) vía la activación de la cinasa de serin trionina Raf-1 (Tabla 5) (Kammanadiminti S, 2003; Gringhuis S, 2007).

En base a lo anterior, no cabe duda de que las lectinas tienen la capacidad de inhibir/bloquear las actividades de los mediadores de la inflamación tales como leucocitos (basófilos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos) y plaquetas liberadoras de 5-HT, histamina, prostaglandinas (especialmente la

ciclooxigenasa 1) y ROS. Por otro lado, favorecen la presencia de plaquetas, linfocitos (células T, células B, macrófagos, células NK), que liberan más citocinas proinflamatorias como IL-1, 12, NFκB, TNF-α, IFN-γ, COX-2, LOX, NO, y ROS (Gabius H, 2001; Assreuy A, 1997; Saba K, 2009; Rabinovich G, 1999; Seo T, 2009).

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de las lectinas.



(Saba K, 2009; Gringhuis S, 2007; Kammanadiminti S, 2003; Gabius H, 2001; Rabinovich G, 1999; Assreuy A, 1997).

III.- JUSTIFICACIÓN

Todos los reportes acerca de las propiedades antiinflamatorias de las plantas medicinales se centran en el estudio de los flavonoides, a pesar de que estas contienen otros metabolitos con acciones potencialmente terapéuticas, como las lectinas. Por lo que en esta tesis se estudió el efecto antiinflamatorio del extracto crudo de jamaica, la fracción proteica de jamaica y la lectina de jamaica (HSL).

En la literatura se encuentra un solo reporte donde se investigó la acción de la administración central de lectinas aisladas en ratones con el fin de estudiar un efecto tipo antidepresivo en la prueba de nado forzado (FST). En dicho estudio las lectinas administradas fueron las lectinas de las semillas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) y de *Canavalia ensiformes* (Concanavalina A, ConA) (Barauna S, 2006).

Teniendo en cuenta la presencia de lectinas en el SNC, y los resultados de los estudios previos de nuestro laboratorio en cuanto al efecto antipirético de *Hibiscus sabdariffa* L, resulta importante el estudio de la administración central de lectinas para determinar su papel en la modulación de la función del SNC y, de manera particular en ésta tesis, el efecto antiinflamatorio de la HSL en el tejido neural.

IV.- HIPÓTESIS

- El extracto crudo, la fracción proteica y la lectina de jamaica (HSL) contenida en el extracto de *Hibiscus sabdariffa* L presentarán efecto antiinflamatorio en tejido neural.

V.- OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto antiinflamatorio del extracto crudo, de la fracción proteica y de la lectina de *Hibiscus sabdariffa* L (HSL) en un modelo de neuroinflamación inducida por LPS.

VI.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer el modelo de neuroinflamación inducida por LPS.
- 2) Evaluar el efecto del extracto crudo, la fracción proteica y la lectina de *Hibiscus sabdariffa* L sobre la respuesta de postración (peso, temperatura, locomoción).
- 3) Evaluar el efecto del LPS, el extracto crudo, la fracción proteica y la lectina de *Hibiscus sabdariffa* L sobre las concentraciones de citocinas circulantes.
- 4) Evaluar el efecto del LPS, el extracto crudo, la fracción proteica y la lectina de *Hibiscus sabdariffa* L sobre las neuronas que rodean al ventrículo lateral, la corteza cerebral y el hipocampo.

VII.- MATERIAL Y METODOS

Substancias.

Se emplearon las siguientes sustancias a los largo de los experimentos propuestos:

- LPS (Sigma: 055:B5): 5 µg ICV.
- Extracto Crudo de *Hibiscus sabdariffa* L (EC): Este extracto consiste de la infusión de 1000 g de hojas de *H. sabdariffa* L en 1000 ml de agua destilada. Se utilizó a una concentración de 270 µg IP.

- Fracción Proteica de *Hibiscus sabdariffa* L (FP): Esta resulta de la extracción de proteínas purificadas y cuantificadas a partir del extracto crudo. Se utilizó a una concentración de 97 µg IP.
- Lectina *Hibiscus sabdariffa* L (HSL): La lectina se purificó a partir de la fracción proteica, y se utilizó a una concentración de 1 µg / 5 µl ICV. Sus características fisicoquímicas son:
 - PM de 32,500 D; pl: 6.85; termoestabilidad: 4 a 80°C, con actividad (pH de 6 a 8); especificidad para Galactósidos.

Animales.

Todo el manejo de los animales y los experimentos se realizaron de acuerdo a lo establecido en la Ley General de Salud y en las Normas Oficiales Mexicanas en materia de investigación en animales de experimentación. Asimismo, se procuró minimizar el sufrimiento de los animales durante la experimentación.

- Ratas macho Sprague Dawley: 350-400 g, 18 semanas de edad.
- n = 5 para cada grupo, utilizando un total de 51 ratas

Inducción de Neuroinflamación

Se compararon dos estrategias: 1) tres aplicaciones intracerebroventricular (ICV) de lipopolisacárido (LPS), 2) una sola aplicación ICV de LPS para generar neuroinflamación inducida en ratas macho (Sprague Dawley) de 16 semanas de edad (300 a 400g).

Cirugía Estereotáxica

Procedimiento: Se insertó la cánula en el porta-cánulas del estereotáxico y se alineó correctamente. Se anestesió al animal vía IP con una mezcla de

clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y clorhidrato de xylazina (6 mg/kg). Una vez que el anestésico produjo su efecto sobre el animal, se rasuró el área de incisión correspondiente y se colocó al animal en el estereotáxico sujetándolo por medio de los lápices en los canales auditivos, y se fijaron los dientes superiores del animal a la parte frontal del estereotáxico, cerciorándose que quedara la cabeza completamente inmóvil. Posteriormente se realizó una incisión rostro-caudal del cráneo, se localizó Bregma y se tomaron las coordenadas correspondientes de antero-posterior, lateral y profundidad. Acto seguido se ubicaron las coordenadas para el ventrículo cerebral lateral derecho, siendo estas: 0.8 mm detrás de bregma, y 1.6 mm lateral (Figura 5). Se realizó una perforación en las coordenadas indicadas y se realizaron dos perforaciones más, en las cuales se colocaron tornillos para darle mayor estabilidad a la cánula. Se implantó la cánula a -1.8 mm de profundidad y se fijó al cráneo utilizando cemento dental. Una vez seco el cemento, se retiró al animal del estereotáxico y se colocó en una caja individual. Se procuró en todo momento que el dolor o malestar de los animales operados se redujera al mínimo. Se dejó recuperar a los animales 7 días.

Manipulación.

Durante los días de recuperación, los animales se manipularon con el objeto que se fueran adaptando a las manos del experimentador y así, tratar de disminuir su estrés el día de experimentación. Durante este procedimiento fue necesario revisar y limpiar los mandriles que están insertados en las cánulas, cerciorándonos de que estas no se encontraran tapadas.

Aplicación intracerebroventricular (ICV) de LPS.

Se inyectó LPS (5 μ g/ μ l, Sigma serotype 0127:B8) al ventrículo lateral cerebral, debajo de la duramadre mediante una canula de 25G y tubería de polietileno acoplados a una jeringa Hamilton de 10 μ l, a una profundidad de 4.5 mm debajo del cráneo. El flujo se mantuvo constante a una velocidad

aproximada de (1 μ l/min). En el modelo de tres aplicaciones ICV de LPS, estas se realizaron una por día durante tres días.

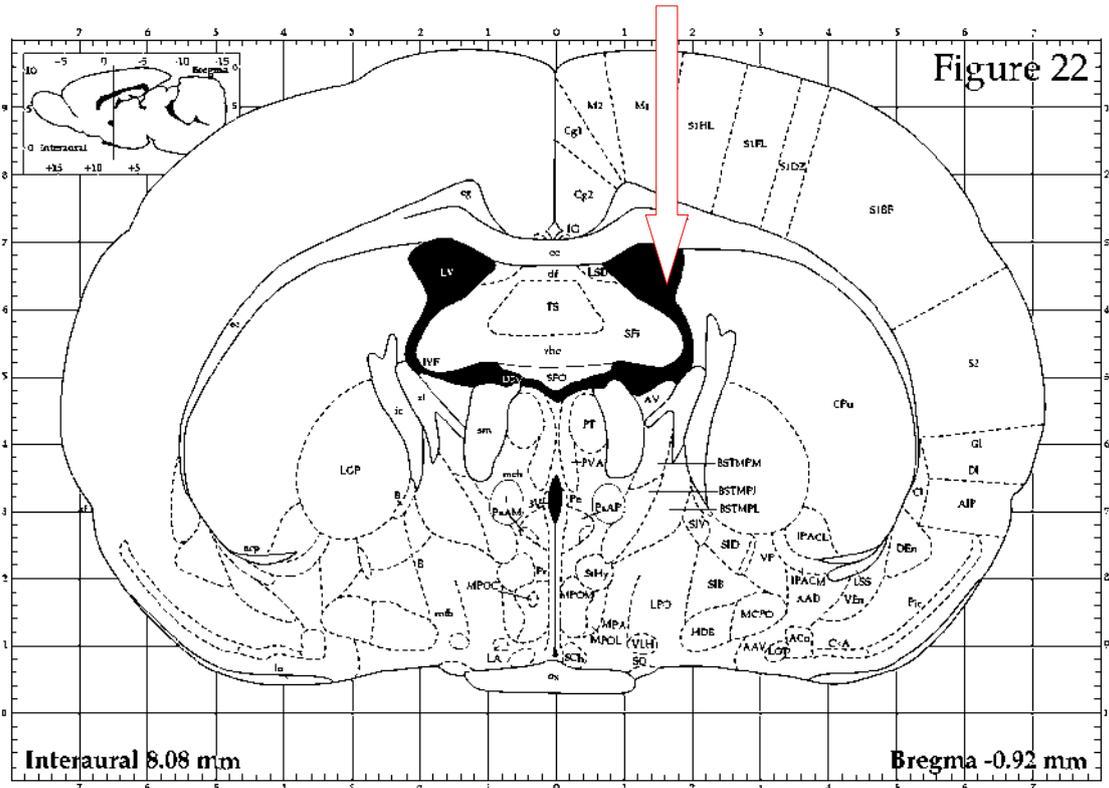


Figura 5. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata. Se destaca en rojo la ubicación de la implantación de la cánula (Esquema modificado de Paxinos G, 2001).

Medición de Peso y Temperatura.

Se obtuvo el peso del animal y se midió la temperatura rectal a la hora 0, y a las 2, 4 y 6 horas posteriores a la aplicación de LPS. En el caso del modelo de tres aplicaciones ICV de LPS, estas se realizaron los tres días a las mismas horas (0, 2, 4 y 6 h). Se obtuvo el peso diario y la temperatura rectal diaria los días posteriores a la aplicación de LPS hasta el día de perfusión.

Campo Abierto.

La prueba de campo abierto se realizó una hora posterior a la aplicación ICV de LPS. Esta prueba consiste en poner al animal durante 5 minutos en una arena rectangular, dividida con una cuadrícula en nueve áreas que corresponden a las esquinas (4), laterales (4) y al centro. Dicha arena cuenta con paredes en sus cuatro caras. Lo que se evalúa en esta prueba es la capacidad de locomoción que presentan los animales tratados con LPS con respecto de los animales vehículo. Las cuantificaciones que se realizan son: el tiempo total que pasan en cada una de las áreas de la arena y el número de cruces que realizan hacia cada uno de los cuadrantes de la misma. En el caso del modelo de tres aplicaciones ICV de LPS, esta prueba se realizó una hora posterior a la primera aplicación de LPS.

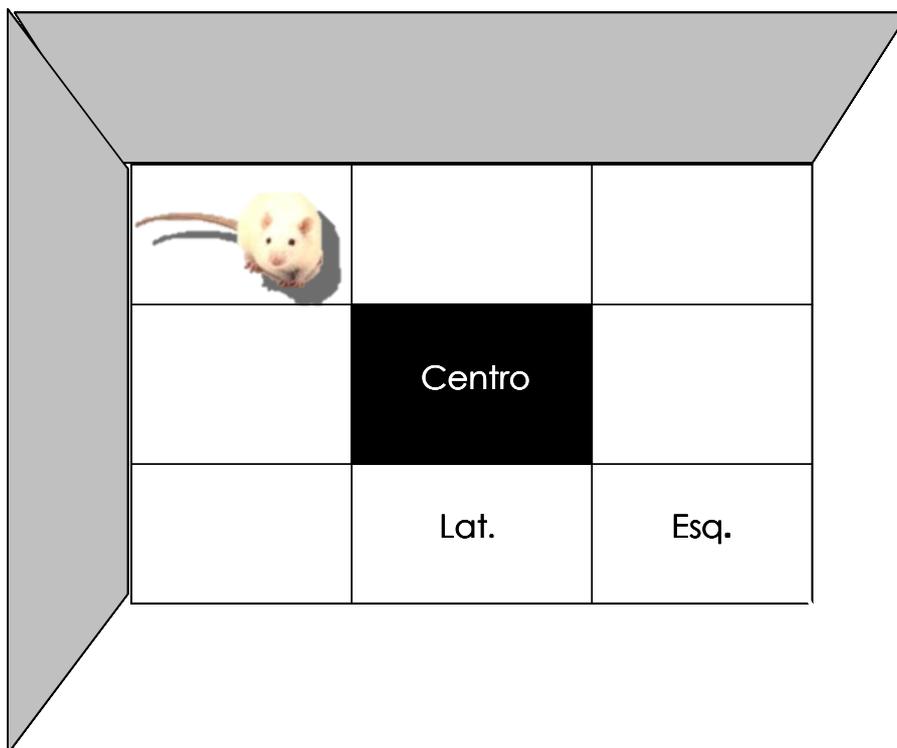


Figura 6. Laberinto de Campo Abierto. Arena rectangular que consta de cuatro zonas laterales, cuatro esquinas y un centro.

Muestra Sanguínea.

Se realizó una toma de muestra sanguínea a las 3 horas posteriores a la aplicación de LPS. La muestra de sangre se obtuvo de la cola del animal. Una vez obtenidas todas las muestras de los animales, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4000 RPM y una temperatura de 4°C. Se obtuvieron alícuotas de 60 µl de plasma para posteriormente realizar ensayos ELISA y de esta manera conocer las concentraciones de Interleucina 1 (IL-1)

Perfusión.

Los animales se anestesiaron profundamente con una sobredosis de ketamina/xylazina. Posterior a la pérdida del reflejo corneal, se colocaron en el sitio de cirugía. Se realizó una incisión en el vientre del animal y se cortaron las costillas lateralmente utilizando pinzas para sostener el tejido cortado y de esta manera exponer el corazón. Se removió el tejido conectivo que rodea al corazón. A continuación se insertó una aguja y se aseguró en el ventrículo izquierdo del animal. Se cortó la aurícula derecha con el fin de liberar la presión en el corazón. Posteriormente se perfundió transcárdialmente con solución salina al 0.9% seguida de una solución de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (0.1M). Una vez terminada la perfusión, se aisló el cerebro del cráneo, se post-fijan por 24 h y se crioprotegió en una solución de sacarosa al 30% en PBS.

Cortes, Tinciones y Análisis Histopatológico.

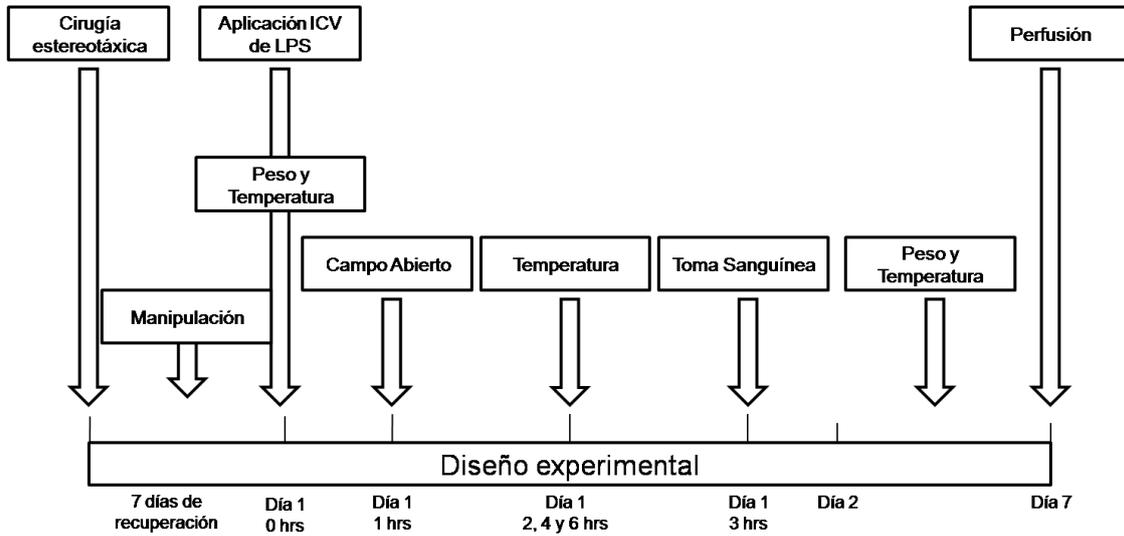
Se realizaron cortes sagitales de 40 µm utilizando un criostato. Para realizar los cortes, se debe ajustarse la temperatura óptima en función de las características del tejido, -18°C. Se extrajo el cerebro del frasco con pinzas y se enjuagó con agua desionizada. A continuación se cortó y removió cuidadosamente el cerebelo con una navaja y se colocó el cerebro en la platina fijándolo con tissue tek. Se realizaron cortes sagitales de 40 µm y una vez que se identificó la zona de interés, se montaron algunos cortes en laminillas

previamente gelatinizadas y otros cortes se recolectaron en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol en buffer de fosfatos 0.1M). Por último se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento histológico.

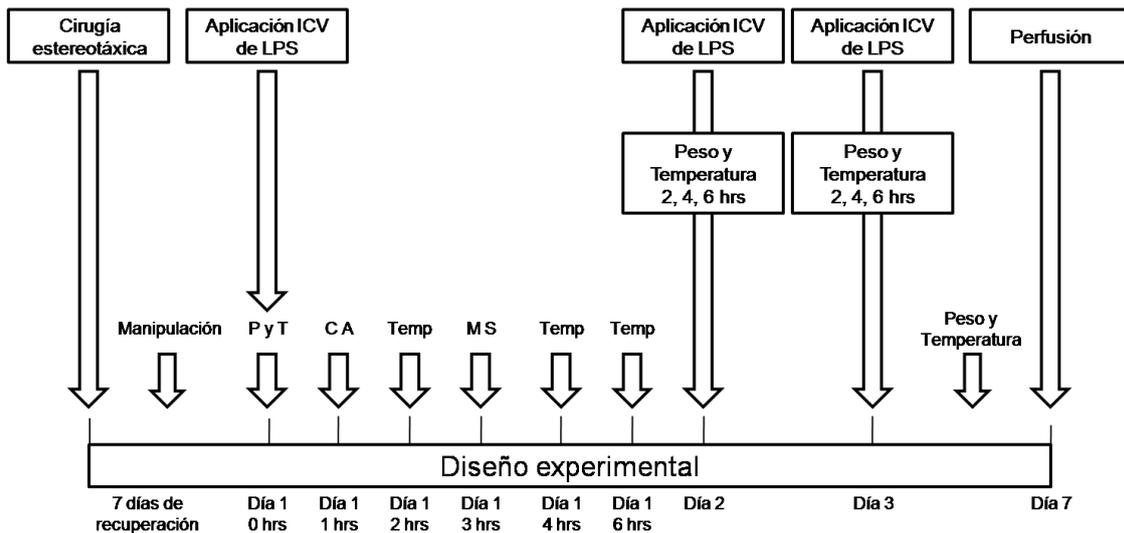
El análisis histopatológico para confirmar la lesión provocada por la aplicación ICV de LPS se realizó mediante microscopía, visualizando las secciones sagitales teñidas con tinción de Hematoxilina & Eosina, con una distancia de 100 µm entre las secciones.

La tinción hematoxilina y eosina es uno de los métodos de tinción mas utilizados en histología. La hematoxilina tiñe estructuras basófilas en tonos azul y púrpura, como los núcleos celulares; mientras que la eosina tiñe estructuras acidófilas en tonos de color rosa, como el citoplasma. El protocolo para esta tinción sugiere que las muestras histológicas pasen por una serie de alcoholes (100°. 95° y 70°). Posteriormente, estas son lavadas en agua para eliminar el exceso de alcohol. Una vez realizado esto, las muestras son sumergidas en hematoxilina por 10 minutos y luego se lavan en agua para eliminar el exceso del colorante. Las muestras pasan rápidamente por alcohol ácido y nuevamente son lavadas en agua. A continuación, las muestras son sumergidas en eosina durante 30 segundos. Al cabo de este tiempo, las muestras pasan por otra serie de alcoholes, en orden creciente (70°, 95° y 100°) y finalmente se dejan en xilol durante 10 minutos, antes de realizar su montaje final.

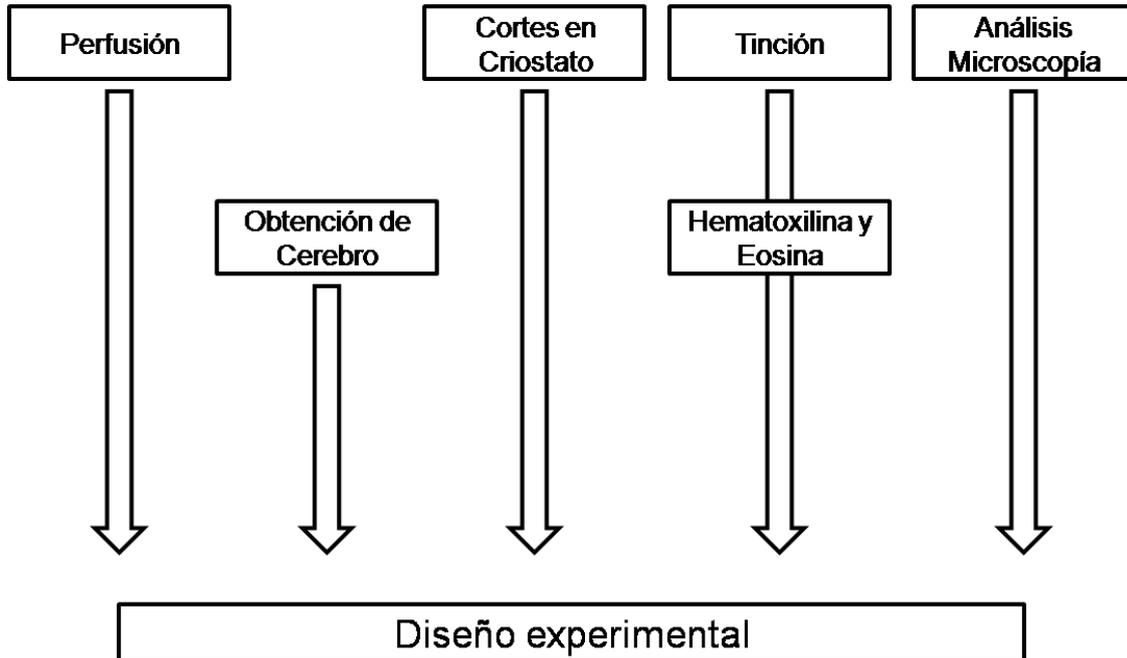
- Diseño experimental I.



- Diseño experimental II.



- Análisis histológico.



VIII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas *t* de Student y ANOVA de una vía (prueba de Newman-Keuls), fueron utilizadas para determinar la significancia estadística entre los valores de los grupos experimentales y control. Los datos se reportan como los promedios \pm error estándar. Los datos obtenidos en la cuantificación de la ganancia o pérdida de peso, la variación de la temperatura, la conducta de locomoción y los niveles de IL-1 se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Los datos obtenidos en la cuantificación el infiltrado celular se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía (prueba de Newman-Keuls). Los datos se reportaron como los promedios de cada experimento I. Los valores de *P* se consideraron significativos cuando fueron * < 0.05 y ** < 0.01 .

IX.- RESULTADOS

Peso.

Se determinó el porcentaje de ganancia o pérdida de peso con respecto al peso inicial de cada uno de los grupos experimentales.

LPS ICV

El grupo tratado con una sola aplicación de LPS (5 µg/µl) mostró una disminución significativa (* P < 0.05) en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto del grupo vehículo al día 2 (Veh 99.59 ± 1.58 Vs 93.09 ± 1.98 LPS) y día 3 (Veh 103.25 ± 1.65 Vs 94.43± 2.32 LPS); así como una disminución significativa (# P < 0.05) en el porcentaje de peso promedio respecto de su peso inicial (gr) al día 2 (% día 2: 94.43± 2.32) posterior a la aplicación de LPS (Figura 7).

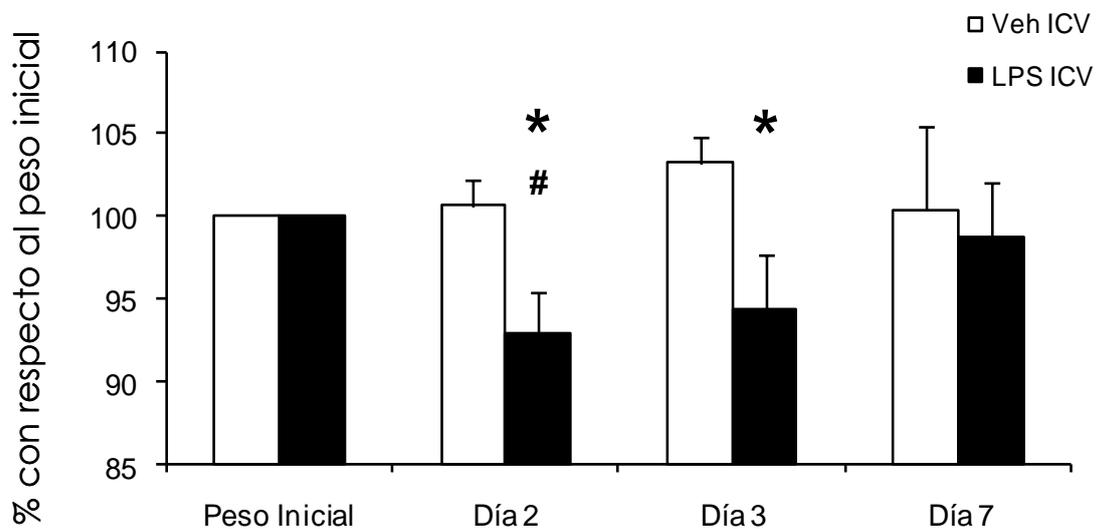


Figura 7. Porcentaje de ganancia o pérdida de peso tras una aplicación de LPS ICV. Prueba t de Student, significancia: * P < 0.05, # P < 0.05. * respecto del grupo vehículo, # respecto de su peso inicial. Día 1: n Veh = 4, n LPS = 5; Día 2: n Veh = 3, n LPS = 4.

El grupo tratado con tres aplicaciones de LPS (5 µg/µl) mostró una disminución significativa en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto del grupo vehículo al día 2 ($p < 0.01$) día 3 ($p < 0.05$), día 4 ($p < 0.05$), y día 7 ($p < 0.05$); así como una disminución significativa en el porcentaje de peso promedio respecto de su peso inicial (gr) al día 2 ($## P < 0.01$) y día 3 ($# P < 0.05$) posteriores a la aplicación de LPS (Figura 8).

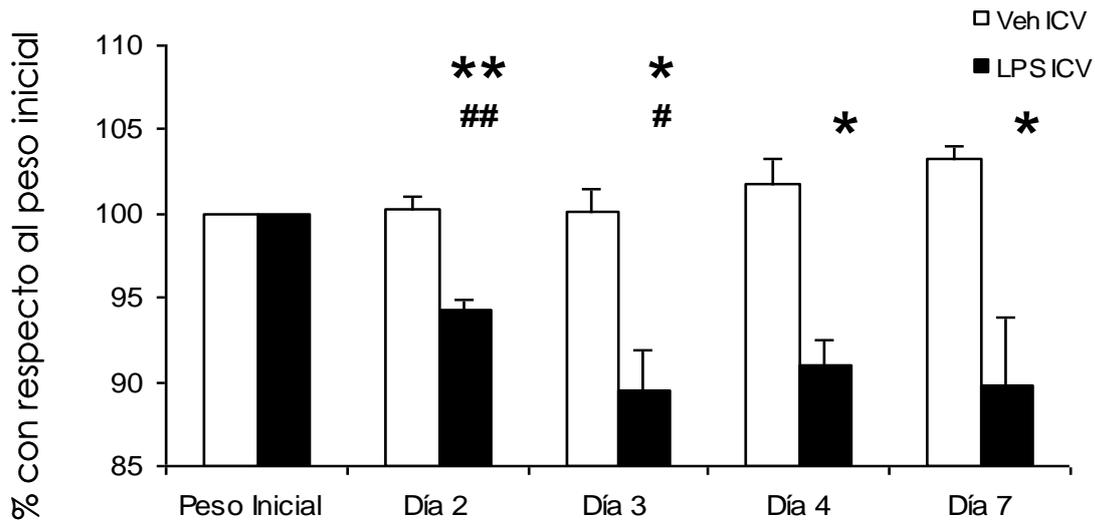


Figura 8. Porcentaje de ganancia o pérdida de peso tras tres aplicaciones de LPS ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo, # respecto de su peso inicial. Día 2, 3 y 7: n Veh = 3, n LPS = 4; Día 4: n Veh = 2, n LPS = 2.

LPS ICV + EC IP

El grupo tratado con LPS (5 µg/µl) ICV + EC (1 ml/100g peso corporal) IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto del grupo EC IP a lo largo del curso temporal; pero si mostró una disminución significativa en el porcentaje de peso promedio respecto de su peso inicial (gr) al día 2 (% día 2: 93.38 ± 1.61 , ## $P < 0.01$) y día 3 (% día 3: 95.21 ± 1.52 (# $P < 0.05$), posterior a la administración de LPS ICV+ EC IP (Figura 9).

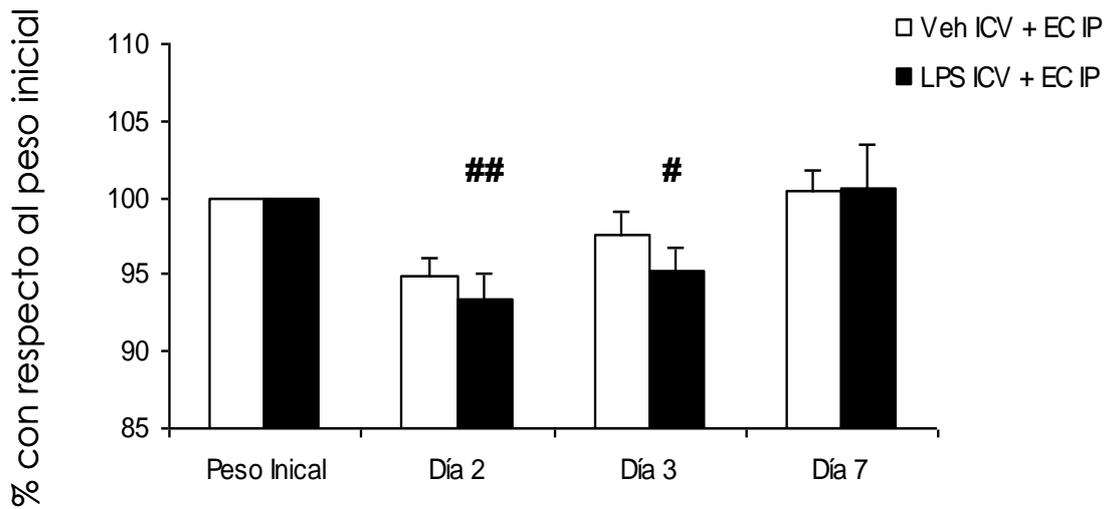


Figura 9. Porcentaje de ganancia o pérdida de peso tras la aplicación de LPS ICV + EC IP. Prueba *t* de Student, significancia: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. # respecto de su peso inicial. n EC IP = 6; n LPS ICV + EC IP = 6.

LPS ICV + FP IP

El grupo tratado con LPS (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ICV + FP (97 μg) IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto de su grupo control respectivo (FP IP) a lo largo del curso temporal, pero si mostró una disminución significativa (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$) en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto de su peso inicial al día 2 (% día 2: 94.38 ± 0.90) y día 3 (% día 3: 95.79 ± 0.70) posterior a la aplicación de LPS. Por otro lado, el grupo FP IP (97 μg peso corporal) mostró una disminución significativa (# $P < 0.05$) en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto de su peso inicial al día 2 (% día 2: 95.47 ± 1.65) (Figura 10).

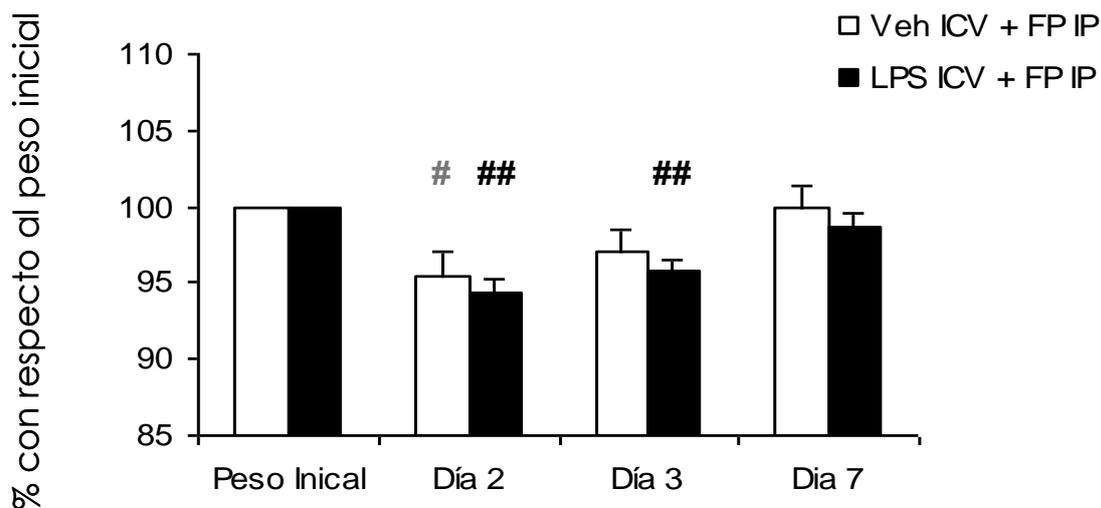


Figura 10. Porcentaje de ganancia o pérdida de peso tras la aplicación de LPS ICV + FP IP. Prueba *t* de Student, significancia: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. # respecto de su peso inicial. n FP IP = 6; n LPS ICV + FP IP = 6.

HSL ICV

El grupo tratado con HSL (1.0 μg) ICV mostró una disminución significativa (* $P < 0.05$) en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto del grupo vehículo al día 3 (Veh ICV 103.25 ± 1.65 Vs 95.44 ± 1.73 HSL ICV); así como una disminución significativa (# $P < 0.05$) en el porcentaje de peso promedio (gr) respecto de su peso inicial al día 2 posterior a la aplicación de HSL (Figura 11).

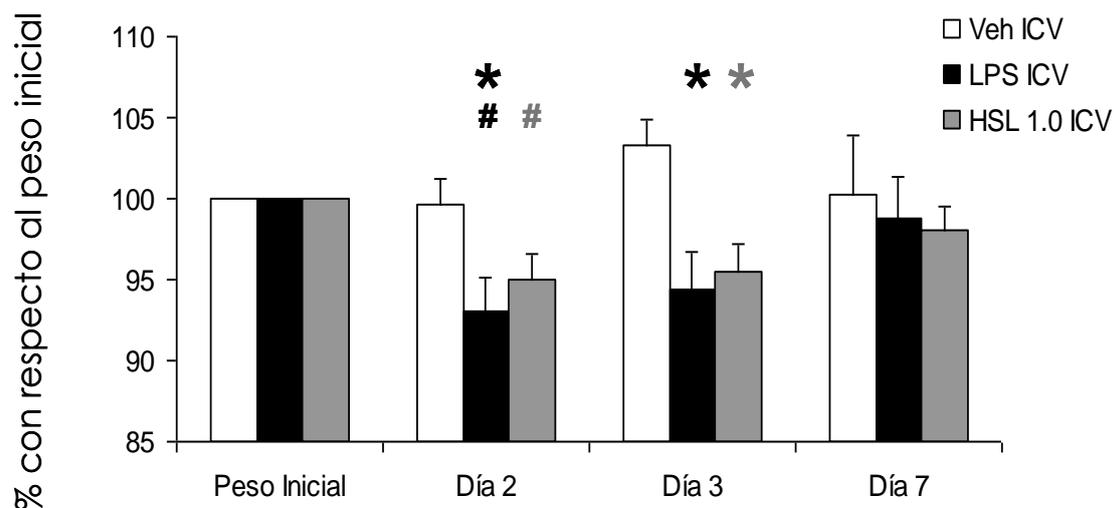


Figura 11. Porcentaje de ganancia o pérdida de peso tras la aplicación de HSL ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, # $P < 0.05$. * respecto del grupo vehículo, # respecto de su peso inicial. n Veh = 5; n HSL = 5.

Temperatura.

Se determinó la variación de la temperatura corporal (deltas) respecto a la temperatura inicial de cada uno de los grupos experimentales

LPS ICV

El grupo tratado con una sola aplicación LPS ICV mostró un aumento significativo (* $P < 0.05$) de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) respecto del grupo vehículo a las 2 h (Veh 0.137 ± 0.11 Vs 0.71 ± 0.18 LPS); así como un aumento significativo respecto de su temperatura promedio inicial a las 2 (## $P < 0.01$) y 6 h (# $P < 0.05$) posteriores a la aplicación de LPS (Figura 12).

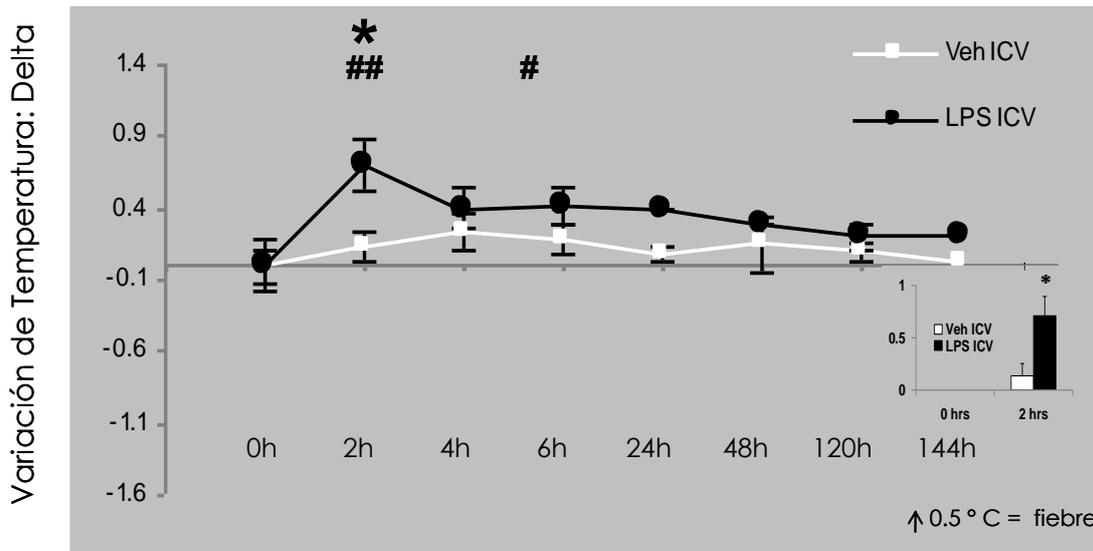


Figura 12. Variación de la temperatura tras una aplicación de LPS ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo, # respecto de su temperatura inicial. n Veh = 8, n LPS = 9.

El grupo tratado con tres aplicaciones de LPS ICV mostró un aumento significativo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) de temperatura respecto del grupo vehículo a las 2 h (Vehí 0.137 ± 0.11 Vs 0.71 ± 0.18 LPS), 24 h (** $P < 0.01$) (Vehí -0.13 ± 0.08 Vs 0.4 ± 0.09 LPS), 30 h (Veh 0.03 ± 0.03 Vs 1.07 ± 0.24 LPS), 52 h (Veh -0.16 ± 0.12 Vs 0.92 ± 0.29 LPS) y 72 h (Veh -0.35 ± 0.05 Vs 0.35 ± 0.05 LPS); así como un aumento significativo (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$) respecto de su temperatura promedio inicial ($^{\circ}\text{C}$) a las 2 h (delta: 0.71 ± 0.18 , ## $P < 0.01$), y a las 6 h (delta: 0.41 ± 0.14), 24 h (delta: 0.4 ± 0.09), 30 h (delta: 1.07 ± 0.24) y 54 h (delta: 0.92 ± 0.27) posteriores a la aplicación de LPS (# $P < 0.05$). 0, 2, 4 y 6 h (Figura 13).

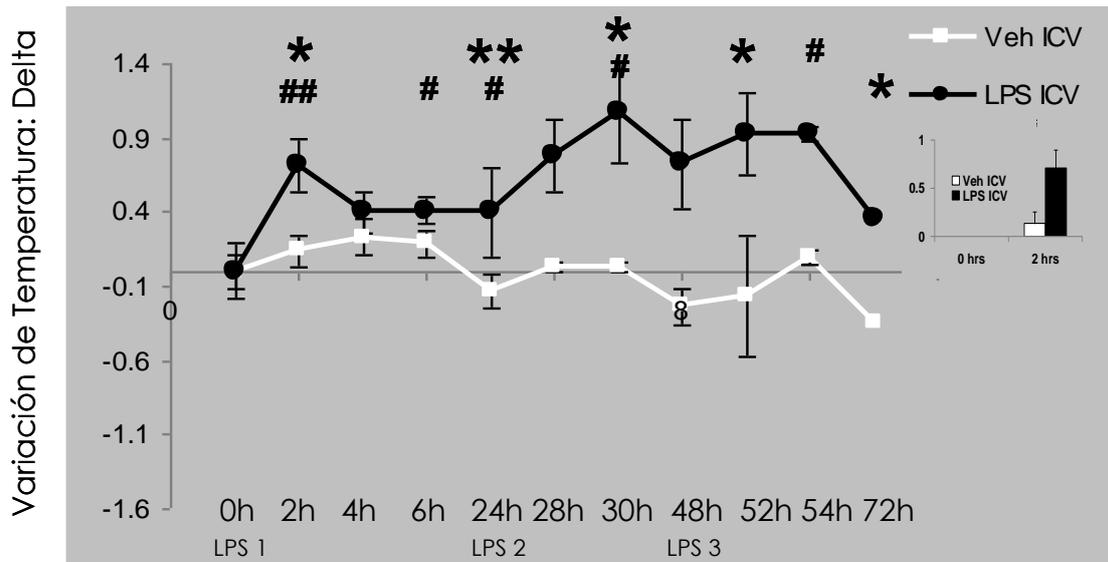


Figura 13. Variación de la temperatura tras tres aplicaciones de LPS ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo, # respecto de su temperatura inicial. n Veh = 8, n LPS = 9; 24, 28, 30, 48, 52 y 54 h: n Veh = 3, n LPS = 4; 72 h: n Veh = 2, n LPS = 2.

LPS ICV + EC IP

El grupo tratado con LPS ICV + EC IP no mostró diferencias estadísticamente significativas de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) respecto del grupo EC IP a lo largo del curso temporal posteriores a la aplicación de LPS ICV + EC IP. Sin embargo, el grupo EC IP mostró una disminución significativa (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$) respecto de su temperatura inicial a las 2 h (delta: -1.11 ± 0.34) y 6 h (delta: -0.28 ± 0.104) posteriores a la aplicación de Veh ICV + EC IP (Figura 14).

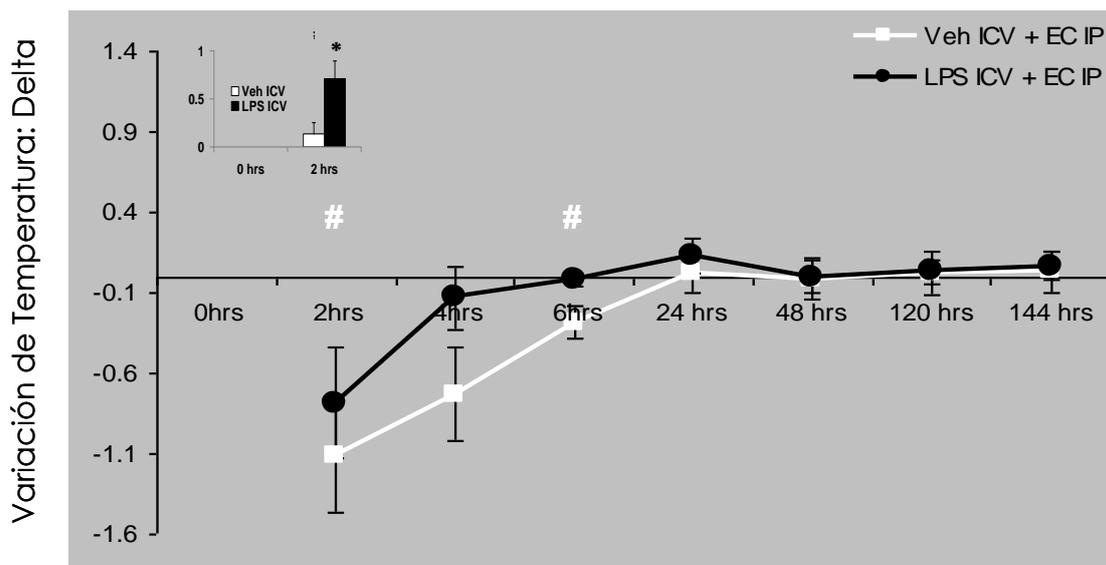


Figura 14. Variación de la temperatura tras la aplicación de LPS ICV + EC IP. Prueba *t* de Student, significancia: # $P < 0.05$. # respecto de su temperatura inicial. n Veh ICV + EC IP = 6, n LPS ICV + EC IP = 6.

LPS ICV + FP IP

El grupo tratado con LPS ICV + FP IP no mostró diferencias estadísticamente significativas de temperatura respecto del grupo FP IP a lo largo del curso temporal posteriores a la aplicación de LPS ICV + EC IP. Sin embargo, sí mostró un aumento significativo respecto de su temperatura inicial a las 24 h (delta: 0.38 ± 0.101) posterior a la aplicación de LPS + FP IP (Figura 15).

HSL ICV

El grupo tratado con HSL (1.0 μg) ICV no mostró diferencias estadísticamente significativas de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) respecto del grupo vehículo a lo largo del curso temporal (Figura 16).

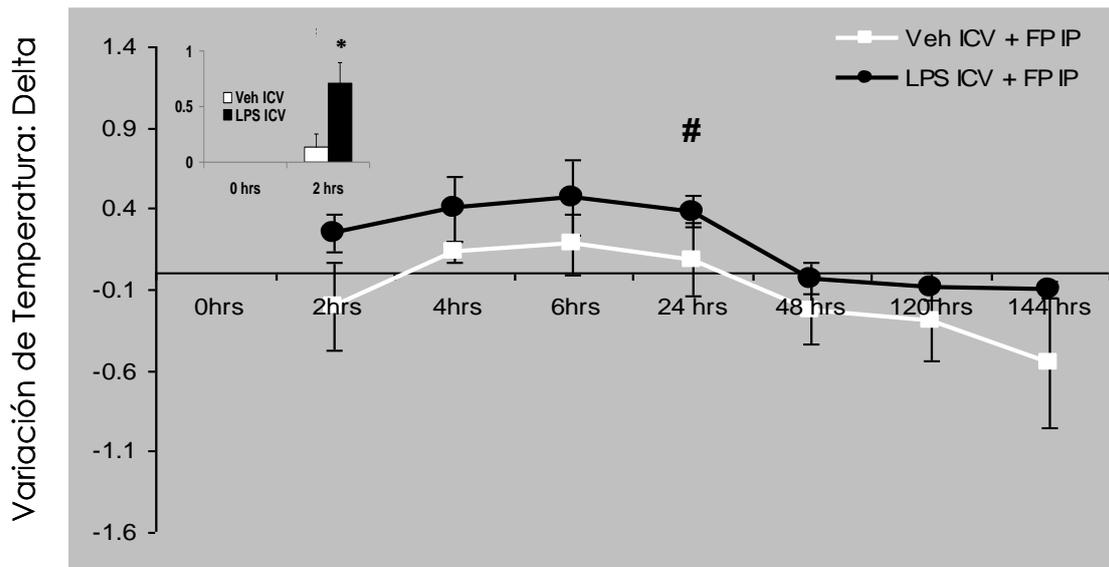


Figura 15. Variación de la temperatura tras la aplicación de LPS ICV + FP IP. Prueba *t* de Student, significancia: # $P < 0.05$. # respecto de su temperatura inicial. n Veh ICV + EC IP = 6, n LPS ICV + FP IP = 6.

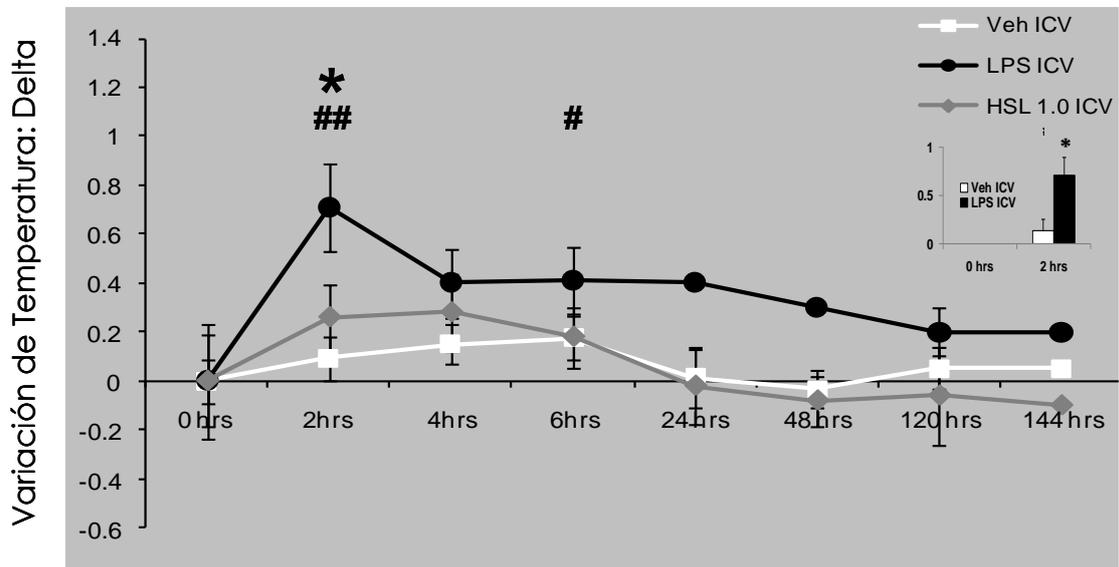


Figura 16. Variación de la temperatura tras la aplicación de HSL ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo, # respecto de su temperatura inicial. n Veh = 12, n HLS = 5.

Campo Abierto.

LPS ICV

Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo tratado con LPS ICV permaneció significativamente (** P < 0.01) menos tiempo (seg) en las áreas laterales respecto del grupo vehículo (Veh 73.70 ± 6.92 Vs 39.83 ± 5.70 LPS). Por otro lado, este grupo permaneció significativamente (** P < 0.01) más tiempo en las esquinas respecto del grupo vehículo (Veh 224.84 ± 7.20 Vs 259.67 ± 5.84 LPS). En cuanto al tiempo de permanencia en el centro, el grupo tratado con LPS permaneció menos tiempo respecto del grupo vehículo, sin embargo, éste no fue estadísticamente significativo (Figura 17).

Número de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo tratado con LPS ICV realizó significativamente (* P < 0.05) un menor número cruces promedio hacia las áreas laterales respecto del grupo vehículo (Veh 26 ± 2.09 Vs 16.75 ± 2.65 LPS). De igual manera, este grupo realizó significativamente (* P < 0.05) menor número de cruces promedio hacia las esquinas respecto del grupo vehículo (Veh 25 ± 1.80 Vs 17.77 ± 2.53 LPS). Por último, el grupo tratado con LPS realizó menor número de cruces promedio hacia el centro respecto del grupo vehículo, sin embargo, éste no fue estadísticamente significativo (Veh 1.12 ± 0.61 Vs 0.33 ± 0.166 LPS) (Figura 17).

Total de cruces realizados en la prueba de campo abierto.

El grupo tratado con LPS ICV realizó significativamente (* P < 0.05) menor número de cruces totales en la prueba de campo abierto respecto del grupo vehículo (Veh 52.12 ± 4.17 Vs 36.11 ± 5.26 LPS), lo que se interpreta como una menor movilidad general. (Figura 18).

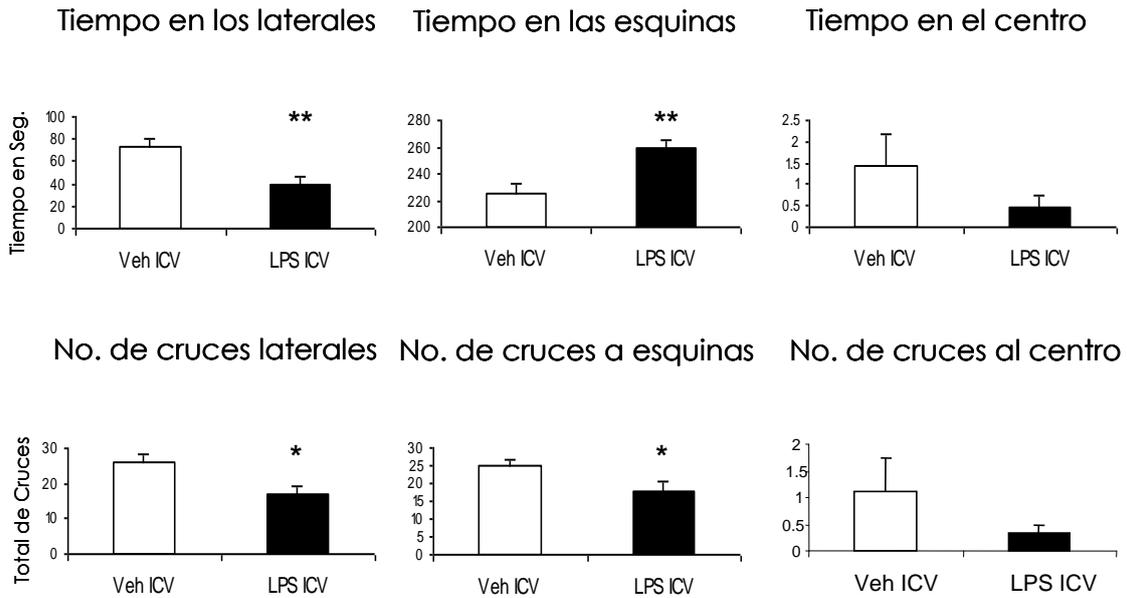


Figura 17. Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV y Total de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo. n Veh = 8, n LPS = 9.

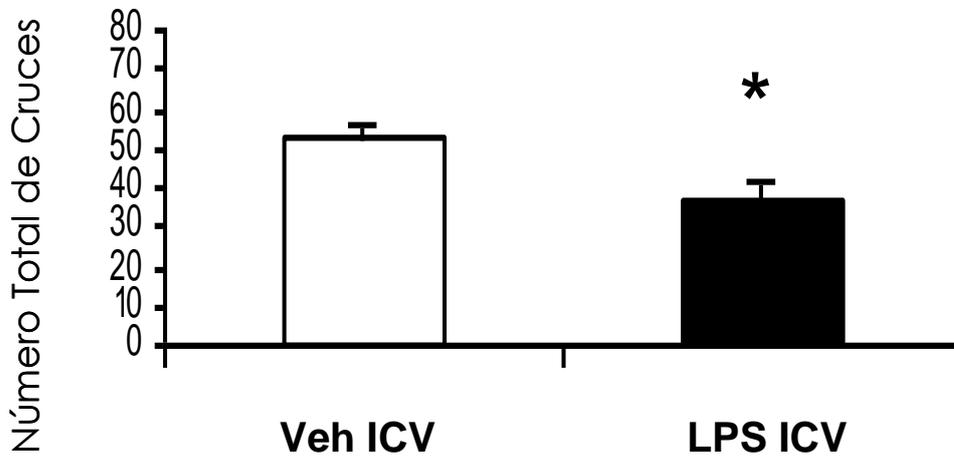


Figura 18. Total de cruces realizados en la prueba de campo abierto tras la aplicación de LPS ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$. * respecto del grupo vehículo. n Veh = 8, n LPS = 9.

LPS ICV + EC IP

Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo tratado con LPS ICV + EC IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en los tiempos promedio (seg) de permanencia en las áreas del campo abierto respecto del grupo EC IP): laterales (EC IP 54.53 ± 9.57 Vs 56.09 ± 8.79 LPS ICV + EC IP); esquinas (EC IP 244.54 ± 9.99 Vs 242.56 ± 9.19 LPS ICV + EC IP); centro (EC IP 0.92 ± 0.507 Vs 1.33 ± 0.53 LPS ICV + EC IP) (Figura 19).

Número de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo LPS ICV + EC IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de cruces promedio hacia las áreas del campo abierto respecto del grupo EC IP: laterales (EC IP 16 ± 2.28 Vs 18.5 ± 3.44 LPS ICV + EC IP); esquinas (EC IP 15.16 ± 1.83 Vs 17.5 ± 3.03 LPS ICV + EC IP); centro (EC IP 0.66 ± 0.33 Vs 1 ± 0.44 LPS ICV + EC IP) (Figura 19).

Total de cruces realizados en la prueba de campo abierto.

El grupo tratado con LPS ICV + EC IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número total de cruces respecto del grupo EC IP) (Figura 20).

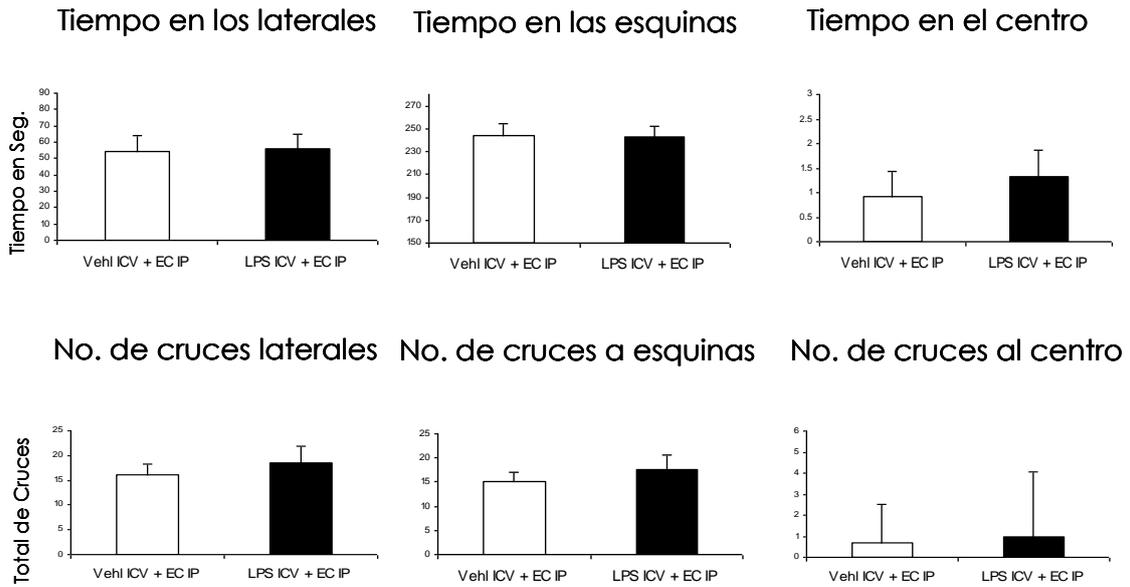


Figura 19. Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV + EC IP y Total de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV + EC IP. Prueba *t* de Student. n EC IP = 6, n LPS ICV + EC IP = 6.

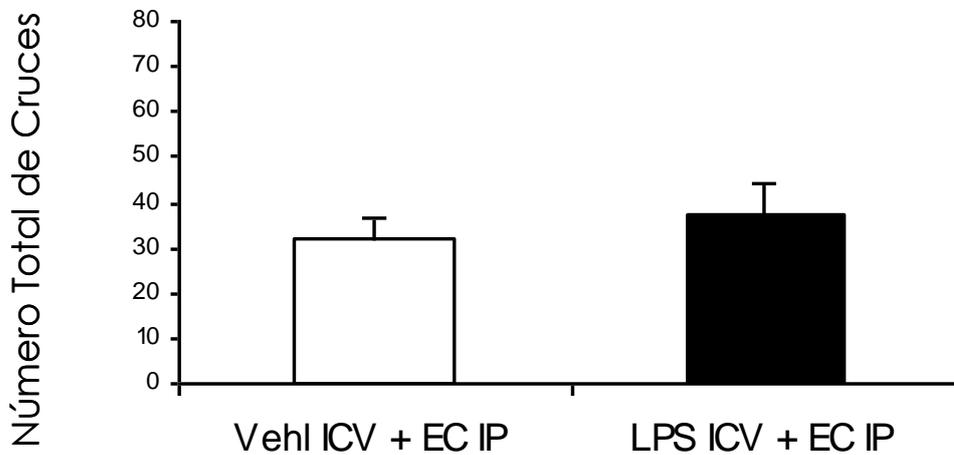


Figura 20. Total de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV + EC IP. Prueba *t* de Student. n EC IP = 6, n LPS ICV + EC IP = 6.

LPS ICV + FP IP

Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo LPS ICV + FP IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de permanencia en las áreas del campo abierto respecto del grupo FP IP en los cuadrantes laterales las esquinas o el cuadrante central (Figura 21).

Número de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo tratado con LPS ICV + FP IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de cruces promedio hacia las áreas del de campo abierto respecto del grupo FP IP tanto en laterales esquinas o centro (Figura 21).

Total de cruces realizados en la prueba de campo abierto.

El grupo LPS ICV + FP IP no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número total de cruces respecto del grupo FP IP (Figura 22).

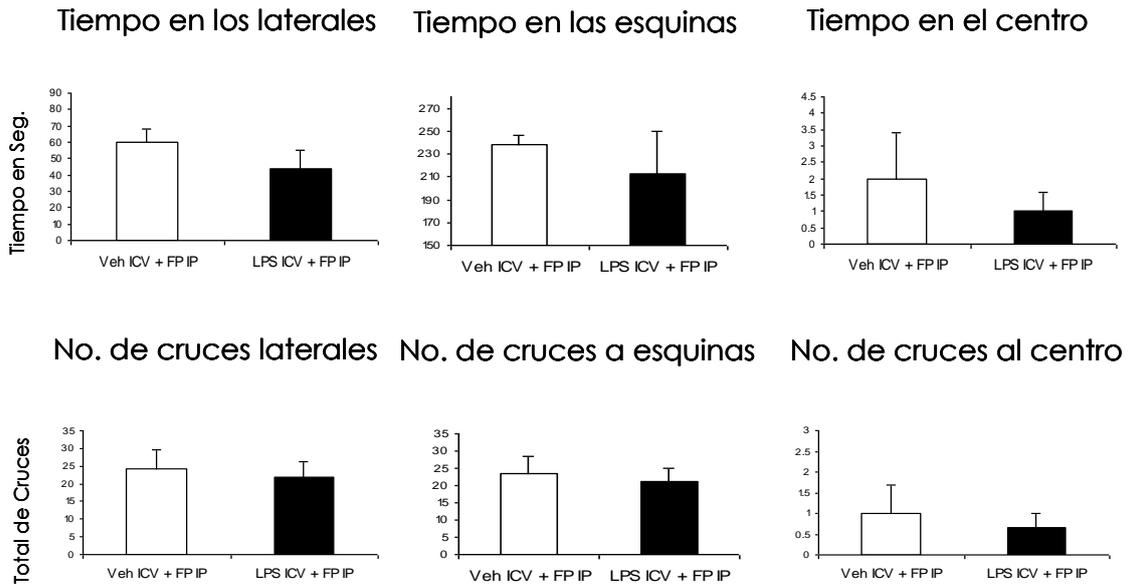


Figura 21. Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV + FP IP y Total de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de LPS ICV + FP IP. Prueba *t* de Student. n FP IP = 6, n LPS ICV + FP IP = 6.

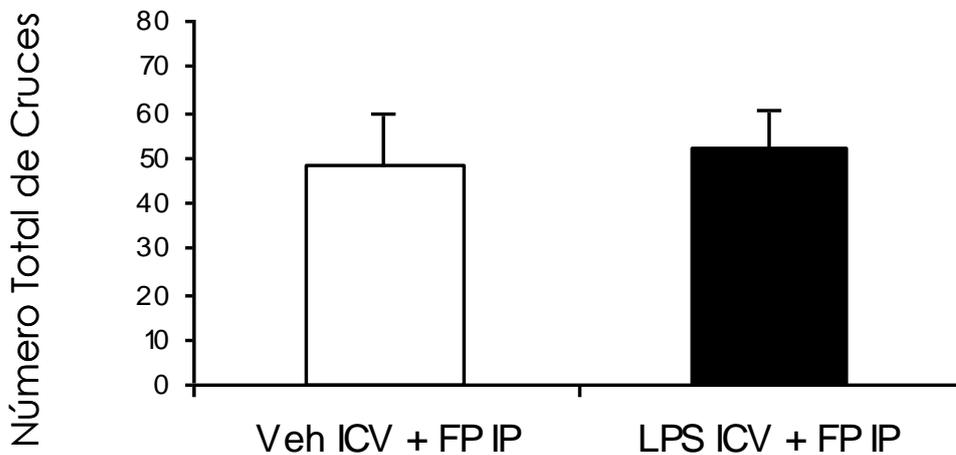


Figura 22. Total de cruces realizados en la prueba de campo abierto tras la aplicación de LPS ICV + FP IP. Prueba *t* de Student. n FP IP = 6, n LPS ICV + FP IP = 6.

HSL ICV

Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo tratado con HSL ICV no mostró diferencias estadísticamente significativas en los tiempos promedio (seg) de permanencia en las áreas del campo abierto respecto del grupo vehículo, tanto en los cuadrantes laterales, las esquinas y el centro (Figura 23).

Por otro lado, el grupo tratado con HSL ICV mostró un aumento estadísticamente significativo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) en el tiempo de permanencia en las áreas laterales del campo abierto respecto del grupo LPS ICV. En cuanto al tiempo promedio de permanencia en las esquinas, este grupo mostró una disminución estadísticamente significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) respecto del grupo tratado con LPS. Por último, el grupo HSL ICV mostró un aumento estadísticamente significativo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) en el tiempo de permanencia en el centro respecto del grupo LPS ICV (Figura 23).

Número de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto.

El grupo tratado con HSL ICV realizó significativamente (* $P < 0.05$) mayor número de cruces hacia las áreas laterales respecto del grupo vehículo. De igual manera, este grupo realizó significativamente (* $P < 0.05$) mayor número de cruces hacia las esquinas respecto del grupo vehículo. Por último, el grupo tratado con HSL realizó mayor número de cruces promedio hacia el centro respecto del grupo vehículo, sin embargo, éste no fue estadísticamente significativo (Figura 23).

Por otro lado, el grupo HSL ICV realizó significativamente (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) mayor número de cruces hacia las áreas laterales respecto del grupo tratado con LPS ICV. De igual manera, este grupo realizó significativamente (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) mayor número de cruces hacia las esquinas respecto del grupo tratado con LPS. Por último, el grupo tratado con HSL realizó

significativamente (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) mayor número de cruces promedio hacia el centro respecto del grupo tratado con LPS (Figura 23).

Total de cruces realizados en la prueba de campo abierto.

El grupo HSL ICV realizó significativamente (* $P < 0.05$) mayor número de cruces totales en la prueba de campo abierto respecto del grupo vehículo. (Figura 24).

Por otro lado, el grupo HSL ICV realizó significativamente (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) mayor número de cruces totales respecto del grupo LPS ICV (Figura 24).

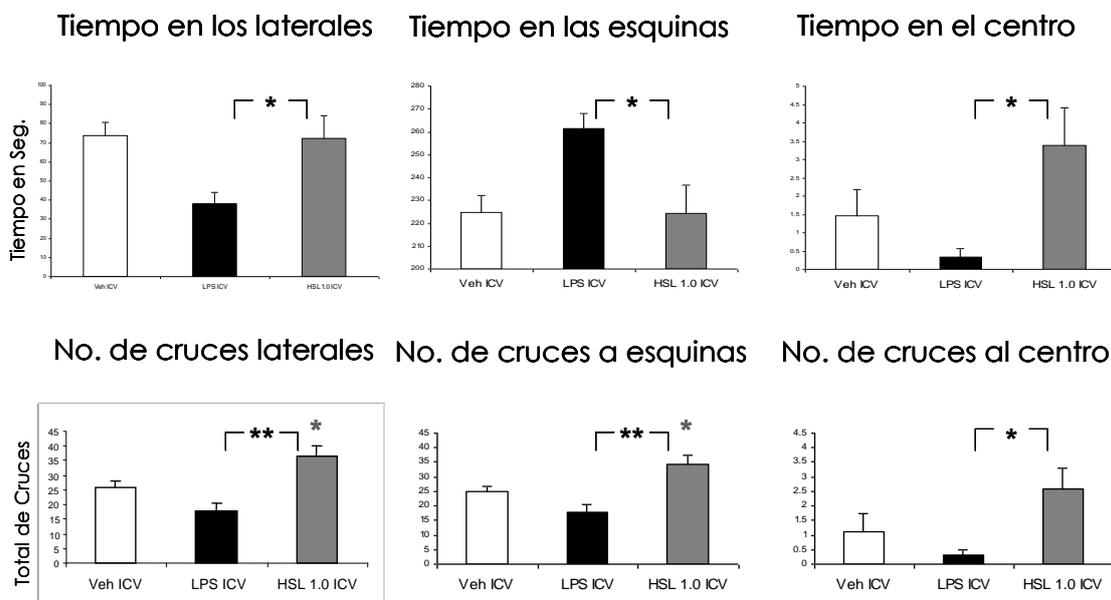


Figura 23. Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de HSL ICV y Total de cruces realizados hacia las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de de HSL ICV. Prueba t de Student, significancia: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo. n Veh ICV = 8, n LPS ICV = 9, n HSL ICV = 5.

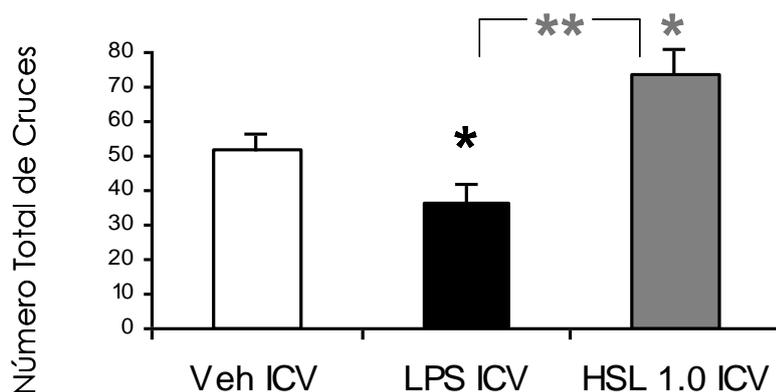


Figura 24. Tiempo total de permanencia en las diferentes áreas del campo abierto tras la aplicación de HSL ICV. Prueba *t* de Student, significancia: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. * respecto del grupo vehículo. n Veh ICV = 8, n LPS ICV = 9, n HSL ICV = 5.

IL-1

Se determinó la concentración plasmática de IL-1 en los animales vehículo y los animales tratados con LPS. El grupo tratado con LPS ICV mostró un aumento en la concentración plasmática de IL-1 respecto del grupo vehículo, sin embargo, este no fue estadísticamente significativo (Figura 25).

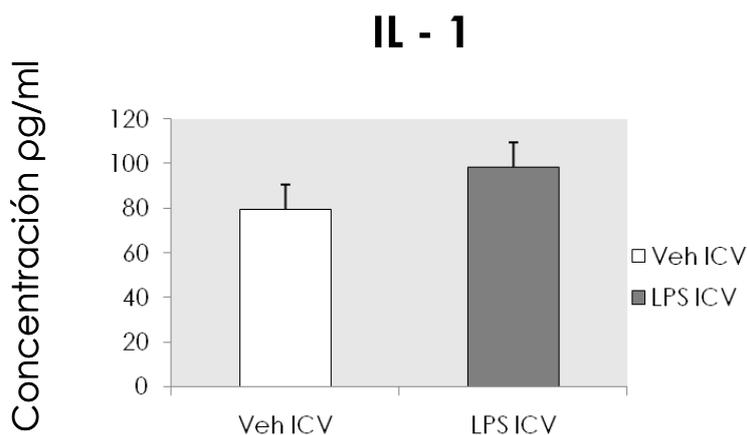


Figura 25. Concentración de IL-1 en plasma tras la aplicación de HSL ICV. Prueba *t* de Student. n Veh ICV = 8, n LPS ICV = 8.

Infiltrado Celular.

Hipocampo.

Los grupos Veh, EC IP, FP IP, HSL ICV, LPS ICV + EC IP y LPS ICV + FP IP mostraron una disminución estadísticamente significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) del infiltrado celular en la región CA1 del hipocampo, en comparación con el infiltrado celular del grupo tratado con LPS ICV (Figura 26, Tabla 6).

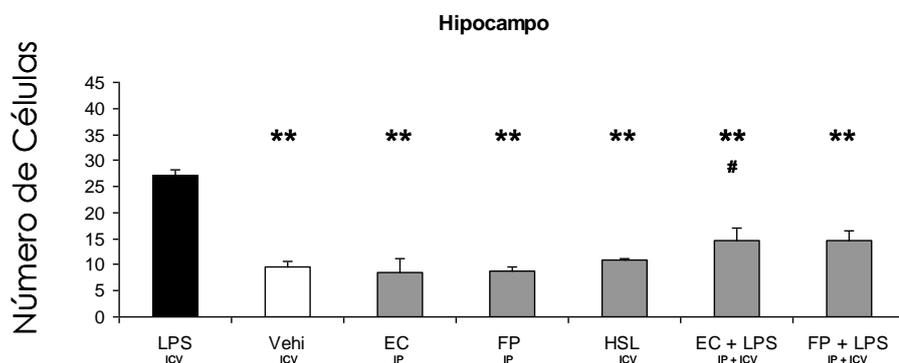


Figura 26. Número de células infiltradas en la región CA1 del hipocampo. Prueba ANOVA (prueba de Newman-Keuls), significancia: ** $P < 0.01$, # $P < 0.05$. Área analizada: 25626.54 μm^2 . n LPS ICV = 5, n Veh = 5, n EC IP = 3, n FP IP = 3, n HSL ICV = 5, n EC IP + LPS ICV = 3, n FP IP + LPS ICV = 3.

Zona Periventricular.

Los grupos Veh, EC IP, FP IP, HSL ICV, LPS ICV + EC IP y LPS ICV + FP IP mostraron una disminución estadísticamente significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) del infiltrado celular en la zona periventricular, en comparación con el infiltrado celular del grupo tratado con LPS ICV (Figura 27, Tabla 6).

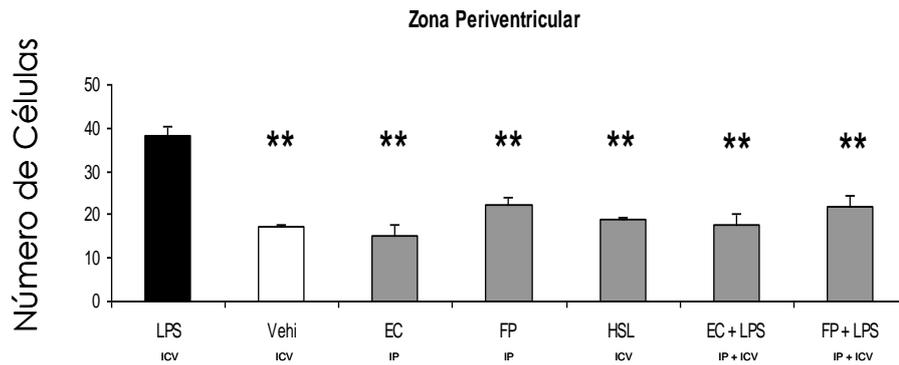
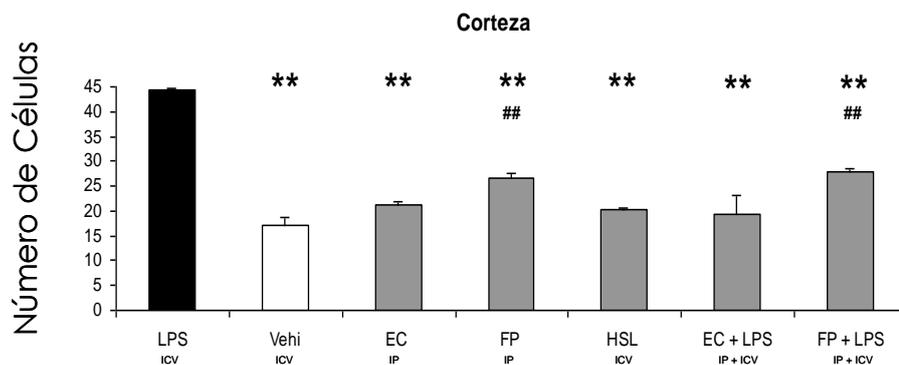


Figura 27. Número de células infiltradas en la zona periventricular. Prueba ANOVA (prueba de Newman-Keuls), significancia: ** $P < 0.01$. Área analizada: $25626.54 \mu\text{m}^2$. n LPS ICV = 5, n Vehi = 5, n EC IP = 3, n FP IP = 3, n HSL ICV = 5, n EC IP + LPS ICV = 3, n FP IP + LPS ICV = 3.

Corteza.

Los grupos Veh, EC IP, FP IP, HSL ICV, LPS ICV + EC IP y LPS ICV + FP IP mostraron una disminución estadísticamente significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) del infiltrado celular en la corteza, en comparación con el infiltrado celular del grupo tratado con LPS ICV (Figura 28, Tabla 6).



Prueba ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Área analizada: $25626.54 \mu\text{m}^2$.

Figura 28. Número de células infiltradas en la corteza cerebral. Prueba ANOVA (prueba de Newman-Keuls), significancia: ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$. Área analizada: $25626.54 \mu\text{m}^2$. n LPS ICV = 5, n Vehi = 5, n EC IP = 3, n FP IP = 3, n HSL ICV = 5, n EC IP + LPS ICV = 3, n FP IP + LPS ICV = 3.

Como un parámetro adicional, se calculó el porcentaje de células infiltradas en cada área analizada, generándose la tabla siguiente de datos (Tabla 6).

Tabla 6. Número de células (media \pm EE) y porcentajes en relación al grupo tratado con LPS (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ICV (100%) en áreas de 25626.54 μm^2 en la región CA1 del hipocampo, zona periventricular y corteza cerebral.

Grupos	Hipocampo		Zona Periventricular		Corteza	
	No. Células	%	No. Células	%	No. Células	%
LPS ICV	27.12 \pm 0.97	100	38.14 \pm 2.16	100	44.39 \pm 0.35 **	100
Vehi ICV	9.71 \pm 0.90 **	35.82	17.05 \pm 0.78 **	44.704	17.21 \pm 1.54 **	38.76
EC IP + Veh ICV	8.58 \pm 2.52 **	31.64	15.16 \pm 2.54 **	39.75	21.08 \pm 0.79 **	47.49
FP IP + Veh ICV	8.83 \pm 0.84 **	32.57 1	22.41 \pm 1.55 **	58.76	26.58 \pm 0.93 **	59.88
HSL ICV	10.9 \pm 0.27 **	40.19	18.73 \pm 0.47 **	49.108	20.25 \pm 0.41 **	45.61
EC IP + LPS ICV	14.6 \pm 2.33 **	53.95	17.66 \pm 2.33 **	46.31	19.27 \pm 3.87 **	43.41
FP IP + LPS ICV	14.75 \pm 1.701 **	54.38	21.72 \pm 2.57 **	56.94	28 \pm 0.66 **	63.07

** P < 0.01, cuando se compara con el grupo tratado con LPS 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ICV.

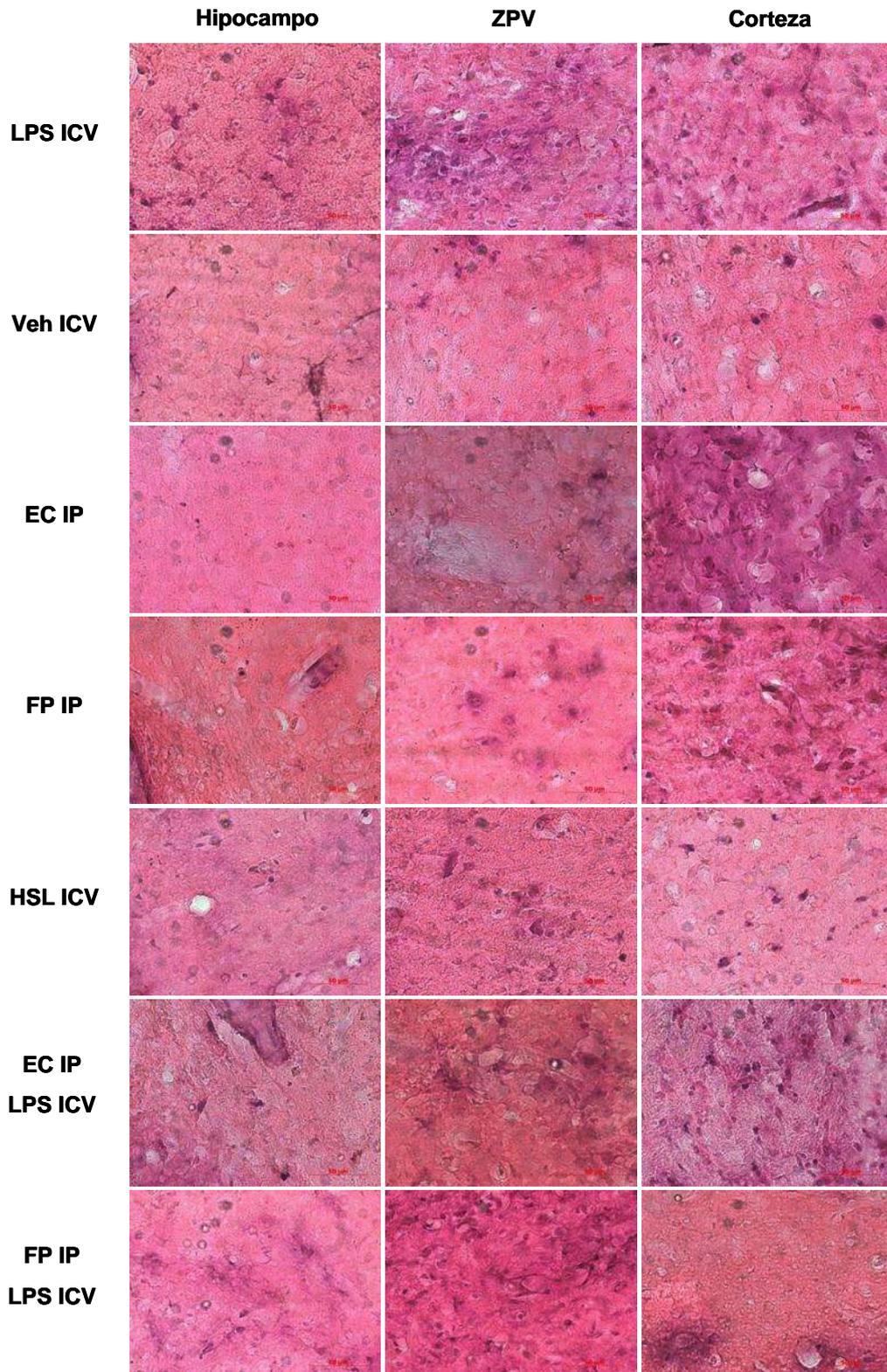


Figura 29. Microfotografías de secciones de cerebro (40 X) teñidas mediante Hematoxilina & Eosina en Hipocampo, Zona Periventricular y Corteza Cerebral.

X.- DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de *Hibiscus sabdariffa* L en un modelo de neuroinflamación inducida por la administración ICV de LPS. En la literatura no se encuentran reportes previos acerca de la actividad antiinflamatoria de *Hibiscus sabdariffa* L (extracto crudo, fracción proteica, lectina de jamaica HSL) en un modelo de neuroinflamación inducido por LPS. Por otro lado, la aplicación de LPS para desencadenar una respuesta inmune se encuentra ampliamente reportada en la literatura, tanto en modelos in vitro como in vivo (, 2009; Min S, 2009; Sumi N, 2009; Tweedie D, 2009; Jang S, 2008; Huang Y, 2008; Yin W, 2007; Chun S, 2006; Felts P, 2005; Rosi S, 2005). Las vías de administración más utilizadas en los modelos in vivo son la intra peritoneal, o las aplicaciones directas en sustancia nigra, cuarto ventrículo e intraespinal (, 2009; Min S, 2009; Felts P, 2005; Rosi S, 2005).

En este trabajo se implementó un modelo de aplicación ICV de LPS. En primer lugar, se comprobó que la implantación de la cánula correspondiera a las coordenadas correctas y sugeridas para el ventrículo lateral cerebral. Para lo cual se administró un colorante a través de la cánula, comprobando que este colorante difundiera a través del ventrículo lateral hacia otras estructuras, como el tercer ventrículo, tiñendo de esta manera dichas áreas y las estructuras vecinas a estas. Una vez que se comprobó que la implantación de la cánula correspondía al ventrículo lateral, comenzó la administración ICV de LPS mediante dos modelos: uno mediante tres aplicaciones de LPS en tres días consecutivos, y otro mediante una sola aplicación de LPS al ventrículo lateral.

Se optó por llevar a cabo el modelo de una sola aplicación de LPS ya que el modelo de tres aplicaciones resultó muy agresivo para los animales. Además de que bastó una sola aplicación de LPS para modificar de manera significativa los parámetros establecidos en éste modelo (respuesta de postración: peso, temperatura, conducta de locomoción), los cuales concuerdan con lo previamente reportado en la literatura, confirmando y validando el modelo de neuroinflamación inducido por LPS desarrollado para

este trabajo (Bartfai T, 2010; Huang Y, 2008; Blatteis C, 2005; Kelley K, 2003).

Es por lo anterior que los experimentos para evaluar los efectos del extracto crudo, la fracción proteica y la lectina de *Hibiscus sabdariffa* L fueron realizados en el modelo de una aplicación de LPS ICV.

Se observó una disminución de peso en los animales tratados con una sola aplicación de LPS (5 µg/µl) ICV respecto del grupo vehículo al día 2 y día 3, así como una disminución respecto de su peso inicial al día 2, recuperando su peso respecto de los animales vehículo al día 7 posterior a la aplicación de LPS (Figura 7). Mientras que los animales tratados con tres aplicaciones de LPS ICV mostraron una disminución de peso respecto del grupo vehículo a los días 2, 3, 4 y 7; así como una disminución respecto de su peso inicial al día 2 y día 3 posteriores a la aplicación de LPS. Estos animales no logran recuperar su peso respecto de los animales vehículo a lo largo del tiempo (Figura 8). Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros modelos de neuroinflamación inducida por LPS ICV en ratones jóvenes y adultos, en los cuales se observó una disminución en la ingesta de alimento en las primeras horas posteriores a la administración de LPS (Huang Y, 2008). También se encuentra reportado en la literatura que la respuesta de postración, mediada por citocinas proinflamatorias, disminuye el apetito de estos animales (Kelley K, 2003). Así mismo, estos resultados sugieren que tres aplicaciones de LPS ICV podrían ser capaces de generar un ciclo auto-propagado de producción y liberación de citocinas proinflamatorias y esta sea la causa de que estos animales no recuperen un peso óptimo comparable al de los animales vehículo. Se ha reportado que el LPS estimula la producción central y periférica de mediadores de la inflamación mediante la activación de NFκB, tales como IL-1, IL-6 y TNF-α, entre otras (Fu X, 2010). Muchos de estos mediadores de la inflamación son importantes mensajeros intracelulares entre las células del sistema inmune y además son capaces de estimular la producción de otros mediadores de la inflamación, como COX-2 e iNOS (Bartfai T, 2010; McClain J, 2009; Sumi N, 2009; Iwalewa E, 2007; Blatteis C, 2005). Muchas de estas citocinas son producidas a nivel central, en el área de la lesión, mientras que otras son

producidas vía periférica y liberadas al torrente sanguíneo, donde son transportadas hasta el sitio de la lesión (Blatteis C, 2005). Así mismo, está reportado en la literatura que estas citocinas son capaces de actuar a nivel hipotalámico, donde se encuentran los centros del hambre y de la saciedad. La estimulación de los núcleos hipotalámicos laterales induce una conducta de alimentación. Mientras que los núcleos hipotalámicos ventromediales inducen saciedad. Por otro lado, en los núcleos arqueados del hipotálamo existen dos tipos distintos de neuronas de especial importancia para el control de del apetito y el gasto energético: las neuronas que producen proopiomelanocortina (POMC) y las neuronas que producen neuropéptido Y (NPY) y proteína relacionada con el agutí (AGRP). La activación de las neuronas POMC disminuye la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético, mientras que la activación de las neuronas NPY/AGRP aumentan la ingestión de alimentos y reducen el gasto energético. Se sabe que la caquexia y la anorexia presentes en el cáncer se deben a la producción y liberación de citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α , las cuales pueden activar las neuronas POMC hipotalámicas (Hall J, 2007). De esta manera, el LPS podría estar disminuyendo la ingesta de alimentos mediante la activación de neuronas POMC en el hipotálamo, vía citocinas proinflamatorias, en los animales tratados con una sola o tres aplicaciones de LPS.

La disminución de peso respecto de su peso inicial en los animales tratados con LPS ICV + EC IP y LPS ICV + FP IP, al día 2 y día 3, puede deberse a la aplicación ICV de LPS. Esta disminución en los primeros días tras la administración de LPS, así como la recuperación de su peso para el día 7, es consistente con los resultados obtenidos en el grupo tratado con LPS ICV (Figura 7, 9 y 10).

Un dato interesante es el observado en el grupo vehiculo tratado con FP, en el cual se presenta una disminución en el peso corporal respecto de su peso inicial al día 2, lo cual podría sugerir que las proteínas presentes en la FP pueden tener un efecto sobre la conducta de alimentación (Figura 10). Este

dato es consistente con el efecto de la lectina HSL administrada ICV, la cual por si misma es capaz de provocar una disminución en el peso de estos animales respecto del grupo vehículo al día 3; así como una disminución respecto de su peso inicial al día 2 (Figura 11). Este efecto podría deberse a que la lectina HSL o las proteínas de la FP podrían estar actuando de manera directa en la regulación de expresión de proteínas o indirecta al regular la respuesta inmune en los centros del hambre y la saciedad.

Es importante destacar que los animales tratados con LPS ICV + EC IP así como los animales tratados con LPS ICV + FP IP no mostraron cambios significativos respecto de los animales vehículo tratados con EC IP y FP IP (Figura 9 y 10). Lo cual sugiere que tanto el extracto crudo como la fracción proteica de *Hibiscus sabdariffa* L pueden estar inhibiendo o bloqueando el efecto de la pérdida de peso provocado por la aplicación ICV de LPS. Con estos resultados no podemos establecer el posible mecanismo por el cual el EC y la FP pudieran estar llevando a cabo este efecto. Sin embargo, un estudio reportado en la literatura, donde se evaluó el efecto inmunomodulador de *Hibiscus cannabinus* L; una planta perteneciente a la familia de las malváceas, a la cual pertenece también *Hibiscus sabdariffa* L; sugiere que esta planta podría estar modulando gran parte de la respuesta inmune estimulada por LPS a través de modular diversas citocinas proinflamatorias, como PGE₂ (Lee Y, 2007), la cual se conoce, es capaz de actuar a nivel hipotalámico (Bartfai T, 2010; Blatteis C, 2005), donde se encuentran los centros del hambre y la saciedad, así como las neuronas relacionadas con la ingesta de los alimentos (Hall J, 2007).

El aumento de la temperatura corporal observado en los animales tratados con LPS ICV, tanto en el modelo de una sola aplicación como en el modelo de tres aplicaciones, es también un fenómeno ampliamente reportado y estudiado en la literatura. Es pertinente mencionar que se considera fiebre a un aumento de 0.5 °C en la temperatura corporal de los animales (Bartfai T, 2010; Blatteis C, 2005; Kelley K, 2003; Boulant J, 2000). El área pre-óptica (POA) del

hipotálamo anterior contiene un gran número de neuronas sensibles al calor y es considerada el centro regulador de la temperatura. Desde esta región se pueden detectar cambios en la temperatura y activar las respuestas necesarias para mantener constante la temperatura corporal (vasoconstricción, piloerección, mayor producción de calor por los sistemas metabólicos). Las responsables son las neuronas sensibles al calor (WSN) y las neuronas sensibles al frío (CSN). Estas neuronas pueden detectar cambios locales de temperatura en el hipotálamo y en el flujo sanguíneo, pueden integrar información acerca de la temperatura de la piel y del estado nutricional del cuerpo mediante las concentraciones de insulina y adiponectina. También se ha demostrado que estas neuronas pueden integrar los efectos de los estados emocionales sobre la temperatura (hipertermia en respuesta al estrés) (Hall J, 2007; Blatteis C, 2005). Las sustancias que provocan fiebre son llamados pirógenos y estos pueden ser exógenos (patógenos, toxinas bacterianas, complejos antígeno/anticuerpo) o endógenos (citocinas). El pirógeno exógeno más utilizado en el estudio de la fiebre es el LPS. El LPS se une de manera específica al receptor TLR4 mediante la formación del complejo LPS-proteína de unión a LPS. Los receptores TLR pueden activar una cascada de señalización en macrófagos y otras células inmunológicas que conducen a la síntesis de citocinas, tales como IL-1, mediante la activación de NFκB. De esta manera, las citocinas tienen una acción pirógena al estimular la producción de prostaglandina E2 (PGE2). En el hipotálamo, la PGE2 juega un papel clave al ser la responsable de afectar el centro termorregulador (Bartfai T, 2010; Blatteis C, 2005; Boulant J, 2000). La fiebre permanece tanto como permanece la producción de pirógenos endógenos. Cuando los pirógenos endógenos son eliminados por el sistema inmune, y los antipiréticos endógenos, tales como la IL-10, son sintetizados y compiten con los pirógenos endógenos, la fiebre puede disminuir (Bartfai T, 2010; Hall J, 2007; Blatteis C, 2005; Boulant J, 2000).

La aplicación de LPS en una ocasión mostró un aumento de la temperatura corporal en estos animales respecto de los animales vehículo a las

2 h posteriores a la administración de LPS ICV, reflejando su efecto máximo en este punto en la línea temporal; así mismo, estos animales aumentaron su temperatura a las 6 h respecto de su temperatura inicial. El efecto en el aumento de la temperatura dejó de observarse 24 h posteriores a la administración de LPS (Figura 12). Sin embargo, en el modelo de tres aplicaciones de LPS, la fiebre permaneció hasta las 72 h posteriores a la primera aplicación de LPS (Figura 13). Es interesante resaltar que en la segunda aplicación de LPS se observa un pico en la elevación de la temperatura similar al que se presenta en la primera aplicación de LPS, manteniendo el comportamiento de la temperatura en una especie de meseta. Este comportamiento de la temperatura podría indicarnos que se habría alcanzado un efecto máximo para la segunda aplicación de LPS; esta posibilidad se ve apoyada por el hecho de que para la tercera aplicación no se observe este pico en la elevación de la temperatura corporal.

El efecto en la disminución de la temperatura corporal observada en el grupo vehiculo tratado con EC IP (Figura 14) y que no se observó en el grupo vehiculo tratado con FP IP (Figura 15), así como el hecho de que la lectina HSL ICV no modificara por sí misma la temperatura corporal (Figura 16), apuntan al hecho de que los componentes no proteicos son los responsables de esta disminución en la temperatura corporal presente en estos animales.

Hibiscus sabdariffa L contiene una gran cantidad de flavonoides (pigmentos), dentro de los que se incluyen antocianinas, hisbiscina, gositina, quercetina, mirecetina, hibiscetina y abedaretina (Prenesti E, 2005). A estos metabolitos se les ha atribuido actividad antipirética (Pérez G, 2003). De la misma manera, se ha reportado la actividad antiinflamatoria y antipirética de la jamaica, la cual ha sido atribuida a estos compuestos (Mahadevan N, 2009).

Por otro lado, estos resultados sugieren de manera substancial que el efecto antipirético observado en los animales tratados con EC IP y FP IP respecto de los animales vehiculo y LPS ICV corresponde a las proteínas y lectinas (HSL) presentes tanto en el extracto crudo como la fracción proteica de

Hibiscus sabdariffa L. Esta aseveración está sustentada en los estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales se ha estudiado y demostrado el efecto antipirético de la lectina HSL administrada por vía oral en un modelo de pirexia inducida con levadura de cerveza (Velázquez M y Fenton B, 2010). De esta manera, se sugiere un efecto antipirético de *Hibiscus sabdariffa* L en este modelo de neuroinflamación inducida por LPS.

La prueba de campo abierto, estudia la conducta de locomoción de los animales tomando como parámetro el número de cruces que estos realizan hacia las diferentes áreas del laberinto, así como el tiempo de permanencia en cada una de las mismas a lo largo de cinco minutos. Lo que está reportado para esta prueba es que los animales vehículo presenten una conducta de exploración a lo largo de la prueba, realizando un mayor número de cruces hacia las esquinas y zonas laterales del laberinto (Denenberg V, 1976). En cuanto al número de cruces hacia el centro del laberinto y el tiempo de permanencia en esta zona, se sugiere que esto denota un efecto ansiolítico de los tratamientos administrados. En este sentido, los animales vehículo a los cuales se les sometió a esta prueba, mostraron una conducta de locomoción que concuerda con lo reportado en otros trabajos (Huang Y, 2008). De igual manera, el hecho de que los animales tratados con LPS ICV realizaran un menor número de cruces totales, indicando una menor locomoción, concuerda con lo reportado previamente para esta prueba asociada a la administración de LPS (Figura 18). Los cambios en la conducta de locomoción observados en la respuesta de postración son atribuidos a la producción y efecto de las citocinas proinflamatorias. De esta manera se ha sugerido que estas citocinas juegan un papel determinante en la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas que cursan con cambios conductuales, como la EA o la EP (Huang Y, 2008; Dantzer R, 2007; Kelley K, 2003).

Resultó evidente a la hora de realizar la prueba el cambio en la conducta de locomoción de los animales tratados con LPS, los cuales realizaban algunas vueltas de reconocimiento sobre la arena para permanecer dramáticamente

postrados la mayor parte de la duración de esta evaluación en las esquinas del campo abierto (Figura 17). Mientras que los animales vehículo, permanecían en movimiento a lo largo de la prueba (Figura 18). El menor número de cruces hacia las esquinas en el grupo tratado con LPS, respecto del grupo vehículo, se relaciona directamente con el aumento en el tiempo de permanencia de estos animales respecto de los vehículo. Así mismo, explica y se relaciona con el menor tiempo de permanencia en las áreas laterales de la arena respecto de los animales vehículo.

El hecho de que los grupos tratados con LPS ICV + EC IP y LPS ICV + FP IP no presentaran cambios conductuales respecto de los animales tratados con EC IP y FP IP sugiere que *Hibiscus sabdariffa* L pudiera estar inhibiendo o contrarrestando los efectos provocados sobre la conducta de locomoción por parte del LPS (Figura 19, 20, 21 y 22). Este dato es consistente y concuerda con los resultados obtenidos en la cuantificación del peso corporal y la variación de la temperatura corporal para estos tratamientos. Es importante destacar el hecho de que la lectina HSL por sí misma produjo un mayor número de cruces totales y en las diferentes áreas del laberinto del campo abierto, lo que sugiere que es capaz de aumentar la locomoción (Figura 23 y 24). Se ha reportado que *Hibiscus sabdariffa* L posee actividad nootrópica administrada por vía oral (100-200 mg/kg/día) tras revertir la amnesia provocada por la escopolamina, los animales fueron sometidos a las pruebas de evasión pasiva y al laberinto elevado en cruz. Los autores de dicho trabajo sugieren que el efecto nootrópico y antiamnésico de *Hibiscus sabdariffa* L se debe a su posible acción como agente anti-acetilcolinesterasa (Joshi H, 2005). Por otro lado, se ha reportado que la administración ICV de la lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) posee un efecto tipo antidepresivo relacionado con los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico (Barauna S, 2006). En conjunto con estos reportes, nuestros resultados sugieren que la lectina HSL pudiera tener algún efecto estimulando la locomoción y la conducta exploratoria de los animales.

Otro parámetro que se encuentra ampliamente reportado y estudiado en la respuesta de postración es la expresión de citocinas proinflamatorias, las cuales son las responsables de provocar dicha respuesta al actuar directamente sobre el cerebro (Brtfai, 2010; Huang Y, 2008; Dantzer R, 2007; Kelley K, 2003). Nuestros resultados en cuanto a las concentraciones plasmáticas de IL-1 no fueron estadísticamente significativos a las 3 h posteriores a la administración de LPS en comparación con los animales vehículo (Figura 25). Se ha reportado que la IL-1 aumenta 30-90 minutos posteriores a la activación de los receptores TLRs (Brtfai, 2010). Cabe mencionar que este parámetro fue analizado parcialmente en una pequeña muestra de nuestros animales.

El hallazgo central de este trabajo es el efecto de *Hibiscus sabdariffa* L sobre el infiltrado celular inducido por la administración ICV de LPS, analizado mediante el conteo de las células inmunes presentes en el tejido cerebral y teñidas con hematoxilina & eosina, en la región CA1 del hipocampo, la zona periventricular y la corteza cerebral.

El hipocampo es una estructura que está íntimamente relacionada con los procesos de memoria y aprendizaje; además, es altamente vulnerable al daño neuronal; es por ello que se decidió analizar el infiltrado celular en esta estructura cerebral. La razón por la cual se analizó el infiltrado celular en la zona periventricular es debido a que el LPS fue administrado directamente al ventrículo lateral cerebral, por lo cual se pensó que en esta zona habría un importante infiltrado celular. El área de la corteza cerebral analizada corresponde a la superficie a través de la cual fue implantada la cánula en estos animales.

Los animales tratados con LPS ICV presentaron un número altamente significativo de células infiltradas en las diferentes zonas muestreadas comparados con los animales vehículo. Por otra parte, los animales tratados con EC IP, FP IP y lectina HSL ICV presentaron una infiltración celular en estas áreas significativamente menor a la de los animales tratados con LPS ICV

(Figura 26, 27 y 28). Más aun, el grado de infiltración celular en dichos grupos fue comparable al observado en el grupo vehiculo en las diferentes zonas analizadas, ya que no hubo diferencias significativas entre ellos. Esto sugiere que *Hibiscus sabdariffa* L no tiene un efecto proinflamatorio por sí mismo a nivel de estas estructuras.

Relevante resulta el hecho de que no se observara una infiltración celular significativa en los animales a los cuales se les administró LPS ICV en combinación con EC IP y FP IP respecto del grupo tratado únicamente con LPS. Estos resultados sugieren que tanto el extracto crudo como la fracción proteica de *Hibiscus sabdariffa* L son capaces de disminuir la infiltración celular provocada por el LPS. Estos hallazgos, aunado al hecho de que la lectina HSL no provocara por sí misma una infiltración celular, sugieren que el efecto observado en estos animales puede ser debido a las lectinas presentes en *Hibiscus sabdariffa* L y no a otros componentes de esta planta como los flavonoides, a los cuales se les ha sido sugerido un efecto antioxidante y antiinflamatorio. Sin embargo, se ha reportado que los flavonoides también pueden llegar a presentar un efecto tóxico y prooxidante (Pérez G, 2003). Por otro lado, se sabe que las lectinas están presentes en el SNC y poseen un efecto antiinflamatorio, modulando la migración de neutrófilos y eosinófilos, modulando la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, así como modulando al factor nuclear de transcripción NFκB mediante la regulación de receptores tipo toll 2 (TLR-2) y mediante la activación de la cinasa de serin trionina Raf-1 (Saba K, 2009; Gringhuis S, 2007; Kammanadiminti S, 2003; Gabius H, 2001; Rabinovich G, 1999; Assreuy A, 1997).

Particularmente importante es el hecho de que el infiltrado celular fuera significativamente menor en el hipocampo, ya que esta estructura es una de las más vulnerables del cerebro y los daños inducidos por diversas sustancias suelen provocar además secuelas tales como deficiencias en la cognición. Por ello, resulta muy importante el hecho de que las lectinas de *Hibiscus sabdariffa*

L disminuyan el infiltrado celular evocado por el LPS, y sugieren un posible efecto como agente neuroprotector. Sin embargo, se necesitan más experimentos para confirmar este efecto.

Como conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *Hibiscus sabdariffa* L modula la respuesta de postración y la respuesta inflamatoria estimulada por la aplicación ICV de LPS y por lo tanto *Hibiscus sabdariffa* L podría tener un efecto potencialmente neuroprotector.

XI. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *Hibiscus sabdariffa* L presenta un efecto antiinflamatorio en el modelo estudiado.
- El extracto crudo y la fracción proteica de *Hibiscus sabdariffa* L inhiben el efecto de la pérdida de peso provocado por la aplicación ICV de LPS.
- Las proteínas y lectina (HSL) presentes en el extracto crudo y la fracción proteica de *Hibiscus sabdariffa* L tienen un efecto antipirético ante la administración ICV de LPS.
- El extracto crudo y la fracción proteica de *Hibiscus sabdariffa* L inhiben o contrarrestan los efectos provocados por LPS sobre la conducta de locomoción.
- *Hibiscus sabdariffa* L no tiene un efecto proinflamatorio en la región CA1 del hipocampo, la zona periventricular o la corteza cerebral.
- El extracto crudo y la fracción proteica de *Hibiscus sabdariffa* L son capaces de disminuir la infiltración celular provocada por la administración ICV de LPS.

XII. PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de HSL frente a l estímulo provocado por el LPS en los parámetros estudiados en este trabajo.
- Medir expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatoria a diferentes puntos en el tiempo.
- Medir expresión de NFκB.
- Medir expresión de receptores TLR.
- Analizar el efecto de *Hibiscus sabdariffa* L sobre los procesos de muerte neuronal.
- Analizar el efecto de *Hibiscus sabdariffa* L sobre la microvasculatura cerebral.

XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aarli J, Dua T, Janca A, Muscetta A. Neurological Disorders: Public Health Challenges. Ed. WHO. Suiza (2006).
- Aggarwal B, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, Sethi G, Bhatt I, Pandey M, Shishodia S, Nair M. From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 10: 87-118 (2006).

- Assreuy A, Shibuya M, Martins G, de Souza M, Cavada B, Moreira R, Oliveira J, Ribeiro R, Flores C. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of Inflammation*, 6: 201-206 (1997).
- Barauna S, Kaster M, Heckert B, Do Nascimento K, Rossi F, Teixeira E, Cavada B, Rodrigues A, Leal R. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85: 160-9 (2006).
- Bartfai T, Conti B. Fever. *The Scientific World Journal*, 10: 490-503 (2010).
- Blatteis C, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 76: 1–18 (2005).
- Borrás J, Navarro A, González M. Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum* sp). *Farmacia Hospitalaria*, 25: 356-362 (2001).
- Boulant J. Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 157–161 (2000).
- Carvajal O, Waliszewski S, Infanzón R. Los usos y maravillas de la jamaica. *La ciencia y el hombre*, 19: 37-40 (2006).
- Castillo A, Abdullaev F. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 57: 55-64 (2005).
- Cheunsuang O, Stewart A, Morris R. Differential uptake of molecules from the circulation and CSF reveals regional and cellular specialisation

- in CNS detection of homeostatic signals. *Cell and Tissue Research*, 325: 397-402 (2006).
- Chiappelli F, Navarro A, Moradi D, Manfrini E, Prolo P. Evidence-Based Research in Complementary and Alternative Medicine III: Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *eCAM*, 3: 411–424 (2006).
 - Chun S, Young S, Gon S, Jahr S, Rok J, Chan S. Anti-Inflammatory Activity of the Methanol Extract of Moutan Cortex in LPS-Activated Raw264.7 Cells. *eCAM*, 4: 327–333 (2007).
 - Coleman J. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clinical & Experimental Immunology*, 129: 4-10 (2002).
 - Colin D, Monteil H. Control of the oxidative burst of human neutrophils by staphylococcal leukotoxins. *Infection and Immunity*, 71: 3724-3729 (2003).
 - Collins B, Ito H, Sawada N, Ishida H, Kiso M, Schnaar R. Enhanced Binding of the Neural Siglecs, Myelin-associated Glycoprotein and Schwann Cell Myelin Protein, to Chol-1 (a-Series) Gangliosides and Novel Sulfated Chol-1 Analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 37637–37643 (1999).
 - Corona T. Las enfermedades neurológicas. I. Su dimensión y repercusión social. *Gaceta Médica de México*, 138: 533–546 (2002).
 - Dalgleish A, O'Byrne K. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. *Advances in Cancer Research*, 84: 231-276 (2002).

- Dantzer R, Kelley K. Twenty Years of Research on Cytokine-Induced Sickness Behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21: 153–160 (2007).
- Denenberg V. Open-Field Behavior In The Rat: What Does It Mean? *Psychological bulletin*, 83: 482-504 (1976).
- Dos Santos L, De Vilhena M, Medeiros P, Almeida G. The Use of Herbal Medicine In Alzheimer's Disease - A Systematic Review. *eCAM*, 3: 441-445 (2006).
- Essa M, Subramanian P. *Hibiscus sabdariffa* Affects Ammonium Chloride-Induced Hyperammonemic Rats. *eCAM*, 4: 321–325 (2007).
- Felts P, Woolston A, Fernando H, Asquith S, Gregson N, Mizzi O, Smith K. Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain*, 128: 1649–1666 (2005).
- Fendrick S, Xue Q, Streit W. Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Journal of Neuroinflammation*, 4: 1-12 (2007).
- Fernández F, Torres M. *Inflamación Y Plantas Medicinales*. <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH0199.dir/doc.pdf> (2003).
- Fu X, Zunich S, O'Connor J, Kavelaars A, Dantzer R, Kelley K. Central Administration of Lipopolysaccharide Induces Depressive-like Behavior in Vivo and Activates Brain Indoleamine 2, 3 Dioxygenase In Murine Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Journal of Neuroinflammation*, 7: 1-12 (2010).

- Gabius H. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: Case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie*, 83: 659–666 (2001).
- Gallego del Sol F, Nagano C, Cavada B, Sampaio A, Calvete J. Lectinas. *Investigación y Ciencia*: 58-67 (2006).
- Griffin W. Inflammation and neurodegenerative diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83: 470– 474 (2006).
- Gringhuis S, Dunnen J, Litjens M, van het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek T. C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-κB. *Immunity*, 26: 605-16 (2007).
- Gullberg, E. Particle transcytosis across the human intestinal epithelium. *Acta universitatis upsaliensis*. Suecia (2005).
- Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiología Médica*. 11ª Ed. Elsevier. España (2007).
- Huang Y, Henry C, Dantzer R, Johnson R, Godbout J. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiology of Aging*, 29: 1744–1753 (2008).
- Iwalewa E, McGaw L, Naidoo V, Eloff J. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2868-2885 (2007).

- Jang S, Kelley K, Johnson R. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *PNAS*, 105: 7534–7539 (2008).
- Jordán J. Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Ámbito Farmacéutico*, 22: 102-112 (2003).
- Joshi H, Parle M. Nootropic Activity of Calyces of *Hibiscus Sabdariffa* Linn. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 5: 15-20 (2006).
- Kammanadiminti S, Mann B, Dutil L, Chadee L. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *The FASEB Journal*: 155-157 (2003).
- Kalovidouris S, Gama C, Lee L, Hsieh-Wilson L. A Role for Fucose α (1–2) Galactose Carbohydrates in Neuronal Growth. *Journal of the American Chemical Society*, 127: 1340–1341 (2005).
- Keith Kelley, Bluth R, Dantzer R, Zhou J, Shen W, Johnson R, Broussard S. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17: S112–S118 (2003).
- Mahadevan N, Shivali, Pradeep K. *Hibiscus sabdariffa* Linn.- An overview. *Natural Products Radiante*, 8: 77-83 (2009).
- McClain J, Phillips L, Fillmorea H. Increased MMP-3 and CTGF expression during lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience Letters*, 460: 27–31 (2009).

- McIntyre L, Quarles R, Brady R. Lectin-Binding Proteins in Central-Nervous-System Myelin. *Biochemical Journal*, 183: 205-212 (1997).
- Min S, Quan H, Ma J, Han J, Jeon B, Seol G. Chronic brain inflammation impairs two forms of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area. *Neuroscience Letters*, 456: 20–24 (2009).
- Mans D, Da Rocha A, Schwartzmann G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *The Oncologist*, 5: 185-198 (2000).
- Nakamura Y, Kozuka M, Naniwa K, Takabayashi S, Torikai K, Hayashi R, Sato T, Ohigashi H, Osawa T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbols ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 35: 997-1007 (2003).
- O'Byrne K, Dalglish A. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *British Journal of Cancer* 85: 473-483 (2001).
- Okamoto T, Gohil K, Finkelstein E, Bove P, Akaike T, Van Der Vliet A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286: 198-209 (2004).
- Parham P. *The immune system*. Ed. Garland. New York (2000).
- Paterson H, Murphy T, Purcell E, Shelley O, Kriynovich S, Lien E, Mannick J, Lederer J. Injury primes the innate immune system for

- enhanced Toll-like receptor reactivity. *Journal of Immunology*, 171: 1473-1483 (2003).
- Paxinos G, Franklin K. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2^a Ed. Academic Press, Estados Unidos de Norteamérica (2001).
 - Pérez G. Los Flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22: 48-57 (2003).
 - Prenesti E, Berto S, Daniele P, Toso S. Antioxidant Power Quantification of Decoction and Cold Infusions of *Hibiscus sabdariffa* flower. *Food Chemistry*, 100: 433-438 (2005).
 - Rabinovich G, Riera C, Landa C, Sotomayor C. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 383-393 (1999).
 - Rosi S, Pert C, Ruff M, Mcgann-Gramling K, Wenk G. Chemokine Receptor 5 Antagonist D-Ala-Peptide T-Amide Reduces Microglia And Astrocyte Activation Within The Hippocampus In A Neuroinflammatory Rat Model Of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 134: 671–676 (2005).
 - Saad B, Azaizeh H, Abu-Hijleh G, Said O. Safety of Traditional Arab Herbal Medicine. *eCAM*, 3: 433-439 (2006).
 - Saba K, Denda-Nagai K, Irimura T. A C-Type Lectin MGL1/CD301a Plays an Anti-Inflammatory Role in Murine Experimental Colitis. *The American Journal of Pathology*, 174: 144-152 (2009).

- Saganová K, Marsala J, Ondrejcek T, Urdzíkova J, Gálik J, Vanický I. Morphological characteristics of lectin labeled microglial cells in the ischemic rat spinal cord. *Biologia, Bratislava*, 59: 761-768 (2004).
- Saklatvala J, Dean J, Clark A. Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochemical Society Symposia*, 70: 95-106 (2003).
- Segura T, Galindo M, Rallo B, Cena V, Jordan J. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Neurología*, 36: 1047-1057 (2003).
- Seo T, Baek K, Kwon K, Lee S, Lim J, Seol I, Kim Y, Seo Y, Namgung U. Shengmai-san–Mediated Enhancement of Regenerative Responses of Spinal Cord Axons After Injury in Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 110; 483-492 (2009).
- Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 2753-2764 (2007).
- Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53-62 (2004).
- Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Lipopolysaccharide-Activated Microglia Induce Dysfunction of the Blood–Brain Barrier in Rat Microvascular Endothelial Cells Co-Cultured with Microglia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 10: 1000-1007 (2009).
- Tuma P, Hubbard A. Transcytosis: Crossing Cellular Barriers. *Physiological Reviews*, 83: 871-932 (2003).

- Tweedie D, Luo W, Short R , Brossi A, Holloway H, Li Y, Yu Q, Greig N. A cellular model of inflammation for identifying TNF- α synthesis inhibitors. *Journal of Neuroscience Methods*, 183: 182-187 (2009).
- Yin W, Signore A, Iwai M, Cao G, Gao Y, Johnnides M, Hickey R, Chen J. Preconditioning Suppresses Inflammation in Neonatal Hypoxic Ischemia Via Akt Activation. *Stroke*, 38:1017-1024 (2007).