



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Efecto Neuroprotector del Extracto y Fracciones de
***Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schtdl.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA:

M. en C. GIOVANNI GARCÍA MORALES

Directores de tesis:

Dr. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Dr. ARTURO AGUILAR ROJAS

Asesor de Tesis:

Dr. J. ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

DR. ARTURO AGUILAR ROJAS

Investigador Asociado B, CIBIS, IMSS
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

ASESOR

DR. J. ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

Investigador Titular, CIBIS, IMSS
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

Los miembros del jurado designados por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Efecto Neuroprotector del extracto y fracciones de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schtdl”**, que presentó el M. en C. Giovanni García Morales, el veintisiete de febrero del dos mil quince.

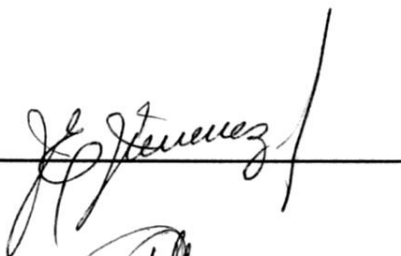
Presidente:

Dr. Rubén Román Ramos
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretario:

Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer
Instituto Mexicano del Seguro Social



Vocal:

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz
Instituto Mexicano del Seguro Social



Vocal:

Dra. Elizabeth Hernández Pérez
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal:

Dr. Manases González Cortazar
Instituto Mexicano del Seguro Social



Agradecimientos

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Giovanni García Morales, agradece el apoyo proporcionado por la beca del CONACYT de septiembre de 2010 a septiembre de 2013, con el número de registro **212779**.

Así mismo, agradece al Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de investigación y por la beca proporcionada de marzo del 2011 al febrero del 2014 (Matricula: 99185086).

La presente investigación se realizó en:



Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.



Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa.

Índice general

Resumen	1
Abstract.....	4
1 Introducción	6
1.1 Trastornos del Sistema Nervioso Central	6
1.1.1 Epidemiología	6
1.1.2 Comorbilidad	7
1.1.3 Depresión	8
1.1.3.1 Fisiopatología y tratamiento.....	9
1.1.4 Ansiedad.....	10
1.1.4.1 Fisipatología de la ansiedad.....	10
1.1.4.2 Epidemiología de la ansiedad.....	10
1.1.4.3 Tratamiento de la ansiedad.....	11
1.1.5 Definición de demencia.....	12
1.1.5.1 Factores de riesgo de la EA.....	13
1.1.5.2 Epidemiología de la EA.....	15
1.1.5.3 Fisiopatología de la EA.....	16
1.1.5.4 Acetilcolina.....	17
1.1.5.5 Acetilcolinesterasa.....	18
1.1.5.6 Neurodegeneración.....	19
1.1.5.7 Tratamientos.....	21
1.1.5.8 Comorbilidad.....	22
1.2 <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) Schlthd	23
1.2.1 Clasificación taxonómica de <i>B. ternifolia</i>	23
1.2.2 Descripción general de <i>B. ternifolia</i>	24
1.2.3 Usos medicinales de <i>B. ternifolia</i>	24
1.2.4 Estudios fitoquímicos de <i>B. ternifolia</i>	25

1.2.5 Estudios farmacológicos de <i>B. ternifolia</i>	25
1.2.6 Estudios toxicológicos de <i>B. ternifolia</i>	26
2 Justificación	28
3 Pregunta de investigación	29
4 Hipótesis	29
5 Objetivo general	30
5.1 Objetivos particulares	30
6 Materiales y métodos	31
6.1 Animales	31
6.2 Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>B. ternifolia</i> (BtHA)	31
6.2.1 Análisis químico de BtHA.....	32
6.3 Fraccionamiento de BtHA	33
6.3.1 Análisis químico de las fracciones obtenidas de BtHA.....	35
6.4 Fraccionamiento de Fr-AcOEt.....	36
6.4.1 Análisis químico del fraccionamiento de Fr-AcOEt.....	37
6.5 Modelos Biológicos	38
6.5.1 Paradigma de Evitación Pasiva (PEP)	38
6.5.2 Natación forzada (NF).....	40
6.5.3 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC).....	41
6.5.4 Campo Abierto (CA)	42
6.5.5 Análisis estadístico	43
6.5.6 Evaluación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa <i>in vitro</i>	44
6.5.7 Inflamación inducida por TPA (12-orto-tetradecanoil-forbol 13-acetato).....	46
6.5.8 Actividad antioxidante por el método de TBARS (Especies Reactivas de Ácido Tiobarbiturico).....	48
7 Resultados y discusión	50
7.1 Rendimientos de BtHA y análisis por HPLC.....	50
7.1.2 Efecto de BtHA en el paradigma de evitación pasiva (PEP)	52
7.1.3 Efecto de BtHA en la prueba de natación forzada (NF)	55
7.1.4 Efecto de BtHA en la prueba de Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)	56

7.1.5 Efecto de BtHA en la prueba de campo abierto (CA)	58
7.2 Primer fraccionamiento de BtHA	59
7.2.1 Evaluación de la actividad enzimática.....	60
7.2.2 Inhibición enzimática	61
7.2.3 Actividad anti-inflamatoria.	63
7.2.4 Actividad antioxidante por el método de TBARS (Especies Reactivas de Ácido Tiobarbiturico).....	66
7.2.5 Análisis químico del primer fraccionamiento de BtHA	68
7.3 Segundo fraccionamiento de BtHA	73
7.3.1 Inhibición enzimática del segundo fraccionamiento de BtHA	74
7.3.2 Actividad anti-inflamatoria del segundo fraccionamiento de BtHA.....	75
7.3.3 Actividad antioxidante por el método de TBARS del segundo fraccionamiento de BtHA	76
7.3.4 Análisis químico del segundo fraccionamiento de BtHA	77
7.4 Fraccionamiento de Fr-AcOEt.....	83
7.4.1 Actividad anti-acetilcolinesterasa y anti-inflamatoria de las fracciones obtenidas de la fracción AcOEt.....	84
7.4.2 Análisis químico de las fracciones de Fr-AcOEt.....	87
7.5 Sub-fraccionamiento de la fracción rica en flavonoides (Flav3).....	89
7.5.1 Análisis químico de las sub-fracciones de Flav3.....	90
8 Conclusiones	94
9 Perspectivas	95
10 Bibliografía	96
11 Anexos	117

Índice de figuras

Figura 1.- Ejemplar de <i>Bouvardia ternifolia</i>	23
Figura 2.- Esquema del primer fraccionamiento de BtHA por bipartición con AcOEt/H ₂ O (1:1).....	34
Figura 3.- Esquema del segundo fraccionamiento de BtHA por centrifugación y cromatografía en columna.....	35
Figura 4.- Fraccionamiento de Fr-AcOEt de donde se obtuvieron las fracciones con mayor polaridad que el ácido ursólico (C1M, C1N, C1Q), y la fracción rica en flavonoides (Flav. 3).....	36
Figura 5.- Dispositivo de Paradigma de Evitación Pasiva, empleado para explorar memoria a corto y largo plazo.....	38
Figura 6.- Prueba de Natacion forzada, utilizado para medir depresión.....	40
Figura 7.- Laberinto Elevado en forma de Cruz, modelo empleado para medir ansiedad.....	41
Figura 8.- Modelo de Campo Abierto, este modelo se usa para medir la actividad motora espontánea.....	42
Figura 9.- Celda de cuarzo utilizada para medir la actividad de la enzima AChE.....	44
Figura 10.- Ratón macho, tratado con éster de forbol para determinar el efecto anti-inflamatorio de BtHA y sus fracciones.....	46
Figura 11.- Análisis cromatográfico por HPLC de BtHA a 350 nm.....	50
Figura 12.- Análisis cromatográfico por HPLC de BtHA a 210 nm.....	52
Figura 13.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA en el parámetro de retención de la memoria en ratones con daño inducido con ESC, en el modelo de PEP.....	53
Figura 14.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA, sobre el tiempo de inmovilidad de los ratones en la prueba de NF.....	55
Figura 15.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA, sobre el porcentaje de cruces (%NA) y de Tiempo (%TA) que los ratones tienen en los brazos abiertos del LEC.....	57

Figura 16.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA, sobre cruces totales y levantamientos verticales en CA.....	58
Figura 17.- Primer fraccionamiento de BtHA. Del cual se obtuvieron las fracciones Acetato de etilo (AcOEt), Precipitado (pp) y Metanólica (MeOH).....	59
Figura 18.- Gráfica representativa de la actividad anti-acetilcolinesterasa, de las diferentes fracciones de BtHA obtenidas del primer fraccionamiento.....	61
Figura 19.- Efecto antiinflamatorio de BtHA y sus fracciones obtenidas del primer fraccionamiento.....	64
Figura 20.- Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones del primer fraccionamiento con respecto a los controles antioxidantes quercetina y α -Tocoferol.....	66
Figura 21.- Placa cromatográfica (CCF) en fase normal (FN) donde se observa la presencia del ácido ursólico y β -Sitosterol en BtHA y Fr- AcOEt.....	68
Figura 22.- Estructura química del ácido ursólico (a) y el ácido oleanólico (b)...	69
Figura 23.- Cromatograma de BtHA, Fr-MeOH, Fr-PP y Fr-AcOEt. En donde se observa la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico a una longitud de onda de 205 nm.....	70
Figura 24.- Segundo fraccionamiento de BtHA, del cual se obtuvieron las siguientes fracciones Fr-1, Sobrenadante de la fracción 2 (SNFr-2), precipitado de la fracción 2 (PPFr-2) y fracción 3 (Fr-3).....	73
Figura 25.- Gráfica que representa el porcentaje de actividad inhibitoria de las fracciones del segundo fraccionamiento de H. A.....	74
Figura 26.- Efecto antiinflamatorio de las diferentes fracciones del segundo fraccionamiento de BtHA, comparadas con el efecto de la fracción AcOEt del primer fraccionamiento.....	75
Figura 27.- Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones del segundo fraccionamiento con respecto a los controles antioxidantes quercetina y α -Tocoferol.....	76
Figura 28.- Placa cromatográfica (CCF) en fase reversa (FR) de las diferentes fracciones del segundo fraccionamiento.....	77

Figura 29.- Cromatograma del sobrenadante de BtHA en donde se observa la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico.....	79
Figura 30.- Fraccionamiento de Fr-AcOEt de donde se obtuvieron fracciones con mayor polaridad que el ácido ursólico (C1M, C1N, C1Q), y una fracción rica en flavonoides (Flav. 3).....	84
Figura 31.- Porcentaje de inhibición enzimática de las fracciones obtenidas del sub-fraccionamiento de AcOEt y la fracción rica en flavonoides.....	85
Figura 32.- Porcentaje de actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de Fr-AcOEt.....	86
Figura 33.- Placa cromatográfica (CCF) en fase normal (FN) de las fracciones obtenidas de Fr-AcOEt.....	87
Figura 34.- Cromatograma de Fr-AcOEt en donde se observa la presencia de escopoletina.....	88
Figura 35.- Cromatograma de la fracción C1M en donde se observa la presencia de escopoletina.....	88
Figura 36.- Cromatograma de la fracción C1N que muestra la presencia de escopoletina.....	88
Figura 37. Esquema del fraccionamiento de Flav 3.....	89

Índice de tablas

Tabla 1. Concentración de glucósido de quercetina, escopoletina, ácido ursólico y ácido clorogénico en BtHA.....	51
Tabla 2. Cuantificación de ácido ursólico y ácido oleanólico presentes en los fraccionamientos 1 y 2 de BtHA.....	82
Tabla 3. Cuantificación de escopoletina las fracciones de Fr-AcOEt.....	89
Tabla 4. Cuantificación de los flavonoides en <i>Bouvardia ternifolia</i>	90

Abreviaturas

β -amiloide	Aβ
12-orto-tetradecanoil-forbol-acetato	TPA
Acetato de etilo	AcOEt
Acetilcolina	ACh
Acetilcolinesterasa	AChE
Ácido Ribo Nucléico	ARN
Ácido Ribo Nucléico mensajero	ARNm
Ácido Tiobarbitúrico	TBA
Adquisición	Adq
Alfa	α
Angiopatía Amiloide Cerebral	ACC
Beta	B
Bouvardín	BVD
Campo Abierto	CA
Carcinoma Ascítico de Ehrlich	EAC
Centímetros	cm
Cloroformo	CHCl₃
Concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción	k_m
Concentración inhibitoria al 50%	IC50
Cromatografía en Capa Fina	CCF
Cromatografía en Columna	CC
Dexametasona	DEX
Diazepam	DZP
Dithio-bis-nitro-benzoato	DTNB
Enfermedad de Alzheimer	EA
Entradas a brazos abiertos en LEC	NA
Entrenamiento	Ent
Escopolamina	ESC

Especies Reactivas de Oxígeno	ROS
Extracto	Exto
Extracto Hidroalcohólico de <i>Bouvardia ternifolia</i>	BtHA
Food and Drug Administration	FDA
Fracción 1 del segundo fraccionamiento	Fr-1
Fracción 2 del segundo fraccionamiento	Fr-2
Fracción 3 del segundo fraccionamiento	Fr-3
Fracción Acetato de etilo	Fr-AcOEt
Fracción metanólica	Fr-MeOH
Fracción obtenida del sub-fraccionamiento de Fr-AcOEt	C1M
Fracción obtenida del sub-fraccionamiento de Fr-AcOEt	C1N
Fracción obtenida del sub-fraccionamiento de Fr-AcOEt	C1Q
Fracción precipitado	Fr-PP
Fracción rica en flavonoides obtenida de Fr-AcOEt	Flav 3
Galantamina	GAL
Gama	Γ
Grados Centígrados	°C
Gramos	g
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Horas	h
Imipramina	IMI
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina	ISSR
Institute of Cancer Research	ICR
Instituto Mexicano del Seguro Social	IMSS
Intraperitoneal	ip
Ioduro de Acetilcolina	ATChI
Kilogramo	Kg
Laberinto Elevado en Forma de Cruz	LEC
Longitud de onda	λ
Malondialdehído	MDA
Metanol	MeOH

Microgramos	μg
Microlitros	μl
Micrometros	μm
Miliamperios	mA
Miligramos	mg
Mililitros	ml
Milímetros	mm
Milimolar	mM
Milimoles	mmol
Minutos	min
Nanómetros	nm
Natación Forzada	NF
Organización Mundial de la Salud	OMS
Óxido Nítrico	NO
Paradigma de Evitación Pasiva	PEP
Precipitado de la fracción 2 del segundo fraccionamiento	PPFr-2
Proteína C-reactiva	CRP
Proteína Precursora Amiloide	APP
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Revoluciones por minuto	rpm
Segundos	seg
Sistema Nervioso Central	SNC
Sobrenadante de BtHA del segundo fraccionamiento	SNBtHA
Sobrenadante de la fracción 2 del segundo fraccionamiento	SNFr-2
Sub-fracción obtenida de la fracción Flav 3	C5C
Sub-fracción obtenida de la fracción Flav 3	C5J
Sub-fracción obtenida de la fracción Flav 3	C5M
Sustancias Reactivas de Ácido Tiobarbitúrico	TBARS
Tiempo de retención	T_R
Tiempo en brazos abiertos en LEC	TA
Ultravioleta	UV

Vehículo	VEH
Velocidad máxima de reacción	V_{max}
Verapamil	VRP
Vía oral	vo

Resumen

Los trastornos del Sistema Nervioso Central (SNC) como pérdida de la memoria, ansiedad y depresión son un problema grave de salud pública a nivel mundial. Se encuentran dentro de las primeras causas de discapacidad de personas en edad productiva. Actualmente afectan a 450 millones de personas y su prevalencia va en aumento.

En el caso de las demencias la de mayor prevalencia es la Enfermedad del Alzheimer (EA) responsable del 70-80% de los casos a nivel mundial y se caracteriza por la muerte neuronal principalmente acetilcolinérgicas; formación de placas β -amiloide, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación microglial que culmina con un proceso neuroinflamatorio..

Los tratamientos actuales para la ansiedad son la administración de benzodiazepinas como el diacepam, los antidepresivos tricíclicos como la imipramina para la depresión y la administración de inhibidores de la acetilcolinesterasa para la EA. A pesar de que los tratamientos son eficaces, el problema de estos tratamientos es que provocan efectos secundarios no deseables.

Este proyecto se enfocó en la búsqueda de un tratamiento alternativo, derivado de plantas medicinales, que ayude a disminuir los síntomas asociados a los diferentes trastornos neurológicos como la pérdida de memoria, ansiedad, depresión, inflamación y daño oxidante, con la menor cantidad posible de efectos secundarios no deseables, por lo cual el objeto de estudio fueron las partes aéreas de *Bouvardia*

ternifolia por sus antecedentes en el uso etnomédico en las afecciones del sistema nervioso central, como antídoto para la intoxicación por picadura de alacrán y mordedura de víbora.

No existen datos sobre alguna evaluación farmacológica de la planta, que constata sus efectos en el SNC, por lo que en el presente trabajo, se usaron diferentes modelos conductuales para evaluar el efecto antidepresivo (natación forzada), ansiolítico (laberinto elevado en forma de cruz), sedante (actividad locomotora en campo abierto), sobre la memoria (evitación pasiva), anti-acetilcolinesterasa (*in vitro*), anti-inflamatoria (edema inducido por TPA) y antioxidante (especies reactivas de ácido tiobarbiturico), mediante la administración oral y/o tópica en ratones, del extracto hidroalcohólico de *Bouvardia ternifolia* (BtHA) o fracciones del mismo.

BtHA, induce efecto antidepresivo a 500 mg/kg, efecto ansiolítico a dosis 100 mg/kg y hasta 500 mg/kg sin llevar a la sedación. Fue capaz de mejorar el parámetro de retención de memoria de manera dosis-dependiente a partir de 100 mg/kg (DE50= 281.5 mg/kg y Emax= 768.8 mg/kg), en ratones que recibieron escopolamina, en el paradigma de evitación pasiva, se demostró que Fr-AcOEt fue la fracción con mejor actividad biológica dosis dependiente, además de inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa (13.81 %), como anti-inflamatoria (86.91 %) y como antioxidante (78.19 %).

A través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se identificó parte de la composición química de BtHA (mg/g de extracto): glucósido de quercetina (9.73), ácido ursólico (15.73), escopoletina (3.23) y ácido clorogénico (0.16).

Si bien se obtuvo importante información de la actividad de *B. ternifolia*, los datos aquí generados indican que es necesario continuar con el seguimiento químico y farmacológico que permita la identificación del modo de acción por el cual esta planta ejerce sus efectos sobre el SNC.

Abstract

Disorders of the Central Nervous System (CNS) as memory loss, anxiety and depression are a serious public health problem worldwide. They are within the leading causes of disability in people of working age. Currently affects 450 million people and its prevalence is increasing.

In the case of the most prevalent dementia is Alzheimer's Disease (AD) responsible for 70-80% of cases worldwide and is characterized by mainly acetilcolinérgicas neuronal death; plaque formation β -amyloid, the formation of reactive oxygen species (ROS) and microglial activation that culminates in a neuroinflammatory process.

Current treatments for anxiety are the benzodiazepines such as diazepam, tricyclic antidepressants such as imipramine for depression and administration of acetylcholinesterase inhibitors for AD. Although treatments are effective, the problem with these treatments is that they cause undesirable side effects.

This project focused on the search for an alternative treatment, derived from medicinal plants, which helps reduce symptoms associated with various neurological disorders such as memory loss, anxiety, depression, inflammation and oxidative damage with the least amount of undesirable side effects, so the object of study was the aerial parts of *Bouvardia ternifolia* by his background in ethno-medical use in diseases of the central nervous system, as an antidote for scorpion sting poisoning and snakebite.

No data exist on some pharmacological evaluation of the plant, which finds its effects on the CNS, so in this paper, different behavioral models were used to evaluate the antidepressant effect (forced swimming), anxiolytic (elevated plus maze in a cross), sedation (open field locomotor activity) on the memory (passive avoidance), anti-acetylcholinesterase (*in vitro*), anti-inflammatory (TPA-induced edema) and antioxidant (thiobarbituric acid reactive species), by oral administration and/or topically to mice, the hydroalcoholic extract of *Bouvardia ternifolia* (BtHA) or fractions thereof.

BtHA induces antidepressant effect at 500 mg/kg, anxiolytic effect at doses 100 mg/kg to 500 mg/kg without lead to sedation. He was able to improve the parameter memory retention dose-dependent manner from 100 mg / kg (ED₅₀ = 281.5 mg/kg and E_{max} = 768.8 mg / kg) in mice given scopolamine in avoidance paradigm passive, showed that Fr-AcOEt fraction was dose dependent with better biological activity, in addition to inhibiting the activity of acetylcholinesterase (13.81%), as anti-inflammatory (86.91%) and antioxidant (78.19%).

Through high performance liquid chromatography (HPLC), part of the chemical composition of BtHA (mg/g extract) was identified: glycoside of quercetin (9.73), ursolic acid (15.73), scopoletin (3.23) and chlorogenic acid (0.16).

While important information on the activity of *B. ternifolia* was obtained, the data generated here indicate the need to continue monitoring the chemical and pharmacological allowing identification of the mode of action by which this plant exerts its effects on the CNS.

1 Introducción

1.1 Trastornos del Sistema Nervioso Central

De acuerdo con la décima Clasificación Internacional de la Enfermedades Mentales (CIE-10) publicada por la Organización Mundial de la Salud, en 1992. Las demencias como la Enfermedad del Alzheimer (EA) y Parkinson forman parte de los “trastornos mentales orgánicos”; sin embargo la ansiedad y depresión forman parte de los “trastornos del humor y afectivos”

Por lo tanto, los trastornos neurológicos son enfermedades del Sistema Nervioso Central y Periférico (cerebro, médula espinal, nervios craneales y periféricos, raíces nerviosas, sistema nervioso autónomo, placa neuromuscular y los músculos). Los trastornos mentales en cambio, son enfermedades psiquiátricas o de la conducta, es decir; enfermedades que se manifiestan principalmente como trastornos del pensamiento, las emociones y del comportamiento. Entre éstas encontramos a la depresión, ansiedad y esquizofrenia (Hosman *et al.* 2001; Hosman *et al.* 2005).

1.1.1 Epidemiología

En el 2001, la OMS publicó que 5 de las 10 primeras causas de discapacidad de personas en edad productiva a nivel mundial son psiquiátricas, en esta publicación se incluyeron los indicadores de discapacidad y mortalidad que dejaron

ver la importancia de los trastornos mentales, posicionándolas como una prioridad en la salud pública (Hosman *et al.* 2001; Posada-Villa *et al.* 2006). La OMS reportó en el 2005, que los trastornos mentales y neurológicos afectaban a aproximadamente 450 millones de personas en el mundo, de los cuales, los trastornos por depresión, ansiedad y esquizofrenia ocupaban los primeros lugares de prevalencia (Kesler *et al.* 2005).

Las proyecciones a futuro estiman que para el 2020, los trastornos mentales y neurológicos serán responsables de 15% de las discapacidades a nivel mundial y la depresión será responsable del 5.7% del total de casos (OMS, 2004). En México los trastornos mentales afectan a aproximadamente 25 millones de personas entre adultos de 18 a 65 años y niños de 4 a 16 años (<http://www.sersame.salud.gob.mx>).

1.1.2 Comorbilidad

En los países occidentales la esperanza de vida es cada vez mayor y ello conlleva a que el número de adultos mayores esté creciendo de forma considerable. Se sabe que las enfermedades que producen demencia como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson también están asociadas a síntomas conductuales y distintos trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad.

Tanto en adultos jóvenes como en ancianos, los trastornos de ansiedad aumentan el riesgo de padecer depresión, en tanto que la depresión aumenta el

riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y de demencia; las más frecuente es la EA que es responsable de entre el 70 y 80% de todos los cuadros demenciales (Small *et al.*, 2000; OMS, 2004).

Diversos factores relacionados con el envejecimiento, como el aislamiento social, el descenso de la autonomía, las bajas percepciones económicas, el declive en el estado de salud o la proximidad de la muerte, son solo algunas de las razones sociales por las que se presenta esta comorbilidad (Baquero *et al.* 2004).

1.1.3 Depresión

La depresión se define como un trastorno afectivo caracterizado por sentimientos de tristeza, pérdida del interés y del placer; así como alteraciones en el apetito, sueño, alteraciones psicomotoras, letargos, preocupaciones y sentimientos de minusvalía y culpa, dificultades en la concentración, pensamientos de muerte los síntomas pueden durar semanas, meses e incluso años. Sin embargo, la mayoría de las personas que padecen de depresión pueden mejorar con ayuda de tratamiento médico (Uriarte Bonilla, 2009). Es el trastorno psiquiátrico con mayor prevalencia, afectando a más de 345 millones de personas en todo el mundo, Se estima que en el transcurso de vida se tiene una probabilidad del 10 % de padecerla, siendo la responsable de la tercera parte de los años de vida perdidos por discapacidad y la primera causa de suicidios a nivel mundial (Karasu *et al.* 2000).

La OMS, en el 2004 identificó diversos factores de riesgo para padecer depresión, entre los que destacan, el historial familiar; los factores genéricos como haber padecido eventos traumáticos, intimidación de compañeros etc. Así como los factores de protección, entre los que se encuentran: sentimiento de dominio, autoestima, autoeficacia, resistencia al estrés y apoyo social (OMS, 2004).

1.1.3.1 Fisiopatología y tratamiento de la depresión

Existen algunas hipótesis sobre las posibles causas de la depresión. Se ha demostrado que en personas con depresión los niveles de aminas biogénicas como la serotonina, noradrenalina y dopamina a nivel SNC; se ha encontrado que personas que padecen de depresión encuentran disminuido la actividad del sistema límbico (amígdala, hipocampo), ganglios basales e hipotálamo. También presentan alteraciones en el eje neuroendócrino Hipotálamo- Hipófisis- Suprarrenal causado por estrés activando al hipotálamo, sistema límbico, corteza cerebral que regulan el esfuerzo y atención (López Piñero, 2002; Uriarte Bonilla, 2009).

En la actualidad existen diversas sustancias que son empleadas en la clínica como fármacos antidepresivos de eficacia terapéutica demostrada, estos se basan en mantener la disponibilidad en el espacio sináptico de las monoaminas serotonina y noradrenalina, inhibiendo a la enzima monoamino oxidasa (MAO) como fenelcina, los antidepresivos tricíclicos como imipramina y los inhibidores de la recaptura a la serotonina y noradrenalina como fluoxetina y venlafaxina (Burghardt *et al.* 2004).

1.1.4 Ansiedad

La ansiedad es una condición fisiológica que permite reaccionar de manera adecuada ante situaciones amenazantes, de estrés o de tensión en la vida cotidiana, manifestándose como una sensación de miedo, que lleva a los individuos a vigilancia, evitación o huida (Gross *et al.* 2004).

Sin embargo, si la valoración de una amenaza es errónea, distorsionada o el estímulo es imaginario, se convierte en un problema de salud denominado “trastornos de ansiedad” (TA). Este conjunto de padecimientos es muy común, a los que se asocia una alta morbilidad con empeoramiento de la funcionalidad social y reducción en la calidad de vida (Ninan, 1999).

1.1.4.1 Fisiopatología de la ansiedad

La respuesta exacerbada ante los estímulos ambientales sobre-activa al eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) y al sistema nervioso autónomo, provocando manifestaciones somáticas de la ansiedad como alteración respiratoria, sudoración, taquicardia, dolor estomacal, sensación de hormigueo y trastornos del sueño (Sandford *et al.* 2000).

1.1.4.2 Epidemiología de la Ansiedad

Los TA tienen una alta prevalencia, ya que se presenta hasta en un 17% de la población mundial y se cree que hasta un 25% de ésta padecerá dichos trastornos

en algún momento de la vida. Se calcula que sólo el 30% de los individuos que sufren este padecimiento están bajo tratamiento médico (OMS, 2004; Kesler *et al.* 2005).

Los TA causan estrago familiar, social y económico, discapacidad, aislamiento social, disminución de la calidad de vida; tienden a ser crónicos y pueden ser tan discapacitantes como las enfermedades somáticas. En general, los trastornos de ansiedad se presentan en etapas relativamente tempranas de la vida. De un 80 a 90 % de los casos se manifiestan entre los 10 y 25 años de edad, periodo que parece ser el de mayor riesgo de desarrollar alguno de estos trastornos (Valencia, 2007).

El panorama en México describe que el 14.23 % de la población con edades de 18 a 65 años presentan algún trastorno de ansiedad; además, éstas encabezan la lista de enfermedades mentales y se cree que afectan aproximadamente a 15 millones de mexicanos (Medina-Mora *et al.* 2003).

1.1.4.3 Tratamiento de la ansiedad

Para el tratamiento de la ansiedad, las benzodiacepinas son los ansiolíticos más utilizados, el diacepam es el más representativo del grupo. El uso de estos ansiolíticos es extenso debido principalmente a su acción rápida y a que son bien toleradas; sin embargo, inducen efectos indeseables como somnolencia, mareo,

sedación, pérdida del equilibrio, disminución de la habilidad psicomotora, confusión, depresión respiratoria y probablemente los más graves de todos, tolerancia y dependencia (Zjorumski *et al.* 1991)

También se ha incluido el uso de antidepresivos en el tratamiento de los TA como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) y noradrenalina (SNRI), inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO) y antidepresivos tricíclicos (ATC). Los efectos adversos más referidos para estas sustancias son: insomnio, náusea, agitación, diarrea, disfunción sexual, hipotensión postural (Nash *et al.* 2004).

1.1.5 Definición de demencia

Demencia, es un término clínico que describe una gran variedad de enfermedades y condiciones. Estas alteraciones, se desarrollan cuando las células del cerebro mueren o no ejercen su función de manera adecuada (Viswanatan *et al.* 2009; Schneider *et al.* 2007). Lo anterior, causa cambios en la memoria, en el comportamiento y en la capacidad de pensar con claridad (Schneider *et al.* 2007; Jellinger *et al.* 2007). A pesar de que una gran variedad de padecimientos son la causa de padecer demencia, una de las principales es la EA. Esta enfermedad es un padecimiento que no solo afecta la calidad de vida del enfermo sino también la de quienes lo rodean. Es por esta razón, que existe un gran interés en su estudio, diagnóstico y tratamiento oportuno (Jellinger, 2007; García *et al.* 2009).

A pesar de que la EA afecta de diferentes maneras a las persona que la padecen, es el deterioro en la capacidad para recordar información nueva una de las afecciones distintivas de la enfermedad (Mangone, 1999). En este sentido, durante la evolución de la enfermedad, se ha demostrado de manera clara la pérdida gradual de la retención de la memoria de eventos recientes con la preservación de los recuerdos más viejos (Ramirez-Bermudez, 2012). Conforme el trastorno progresa, se van dañando otras funciones como, la pérdida en la habilidad para realizar cálculos, manipular objetos y/o instrumentos comunes (Hardman *et al.* 2003). Todos estos síntomas, son causa de la disfunción irreversible de las células cerebrales principalmente, en aquellas regiones del cerebro involucradas en la formación de nuevos recuerdos.

En la actualidad, el diagnóstico de la EA se basa en la valoración clínica y en pruebas de laboratorio para excluir otros padecimientos (Hardman *et al.* 2003; Alzheimer's Association, 2012).

1.1.5.1 Factores de riesgo de la EA

El diagnóstico de la EA, habitualmente se da después de los 65 años de vida por lo tanto, la edad es considerada como el principal factor de riesgo para padecerla. En este contexto, el historial familiar juega también un papel importante en la incidencia de padecer la enfermedad (Green *et al.* 2002; Ramirez-Bermudez, 2012). Recientemente, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, publicó

un reporte en el que proporciona datos para prevenir el deterioro cognitivo de los pacientes con demencia. En éste, se incluye una revisión sistemática de los factores de riesgo para padecer EA. La edad avanzada y la historia familiar de demencia, como se ha mencionado, son consideradas como importantes factores de riesgo. Así mismo, otros factores como el genotipo de la apolipoproteína E alelo e4, son características consistentes en este reporte (Daviglius *et al.* 2010).

Por otro lado, el mencionado reporte considera como factores de riesgo modificables o factores protectores para identificar la demencia, los puntos que a continuación se mencionan:

Reserva cognitiva (educación y ocupación): un alto nivel de educación, un índice de coeficiente intelectual elevado y una ocupación de alto nivel parecen proteger contra la aparición de la EA y otras formas de demencia (Meng *et al.* 2012; Sharp *et al.* 2011).

Factores de riesgo cardiovasculares (fumar, hipertensión, diabetes y obesidad): estudios recientes sugieren que el tabaquismo incrementa el riesgo de desarrollar todas las formas de demencia incluyendo EA (Almeida *et al.* 2009; Anstey *et al.* 2009; Peters *et al.* 2008). La diabetes también incrementa el riesgo de desarrollar alguna demencia y EA (Plassman *et al.* 2010; Lu *et al.* 2009). La asociación de hipertensión, colesterol y obesidad es bastante compleja sin embargo la aparición de éstos padecimientos en una edad media incrementa el riesgo de una

aparición de demencia tardía (Anstey *et al.* 2011; Beydoun *et al.* 2008; Profenno *et al.* 2010; Plassman *et al.* 2010).

Estilo de vida y factores psicosociales (depresión, actividad física y alcoholismo): Un historial de depresión se asocia positivamente con todas las formas de demencia y EA (Plassman *et al.* 2010; Ownby *et al.* 2006). El análisis de efectos de latencia sugieren que es más común que la depresión se refleje como una asociación causal que como un síntoma de demencia (Ownby *et al.* 2006). El consumo leve o moderado de alcohol parece tener un efecto protector, mientras que el consumo en exceso parece tener el efecto contrario (Plassman *et al.* 2010; Anstey *et al.* 2009; Neafsey *et al.* 2011; Peters *et al.* 2008). Algunos estudios sugieren que la actividad física tiene un fuerte efecto protector contra la EA (Hamer *et al.* 2009; Sofi *et al.* 2011).

1.1.5.2 Epidemiología de la EA

En el año 2009 se estimaba que 36 millones de personas vivían con EA en todo el mundo y se espera que esa cifra incremente a 66 millones para el año 2030 y a 115 millones en el año 2050. Casi dos terceras partes de estas personas viven en países con bajos recursos, donde el número de casos incrementa a medida que aumenta la población de ancianos (World Alzheimer Report, 2009).

Actualmente, esta enfermedad es la primera causa de demencia en el mundo (IMSS, 2007). La población con mayor riesgo de padecerla, son los adultos mayores

a 60 años, lo que convierte a este padecimiento en un importante problema de salud pública. De acuerdo a estimaciones realizadas en los Estados Unidos, se determinó que tan solo para el año 2000, 4.5 millones de personas padecían esta enfermedad y se calcula que para el año 2050 este número se incrementará hasta los 13 millones (García *et al.* 2009).

En México, según datos reportados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el año 2007, existían 500 mil casos de EA. Esta cifra, podría triplicarse considerando el aumento en la expectativa de vida de las personas. Así mismo, de acuerdo a esta misma fuente, se estima que para el año 2050, uno de cada 4 mexicanos tendrá 65 años y será propenso a padecer esta enfermedad (IMSS, 2007). En consecuencia, al considerar los datos epidemiológicos actuales, las predicciones y los estragos personales, familiares, sociales y económicos que la EA ocasiona, se establece que este padecimiento es y será un grave problema de salud pública a nivel nacional y mundial (García *et al.* 2009).

1.1.5.3 Fisiopatología de la EA

El deterioro cognitivo en pacientes con EA, está estrechamente asociada con la degeneración progresiva del sistema límbico, las regiones neo-corticales y el cerebro anterior basal (Crews and Masliah, 2010). Este proceso neurodegenerativo está caracterizado por el daño a la sinapsis con degeneración retrograda de los axones y la eventual atrofia del árbol dendrítico (Perlson *et al.* 2010).

Las causas de la pérdida de la integridad neuronal durante la EA son varias, sin embargo, esta enfermedad se caracteriza principalmente, por la deposición de placas β -amiloide ($A\beta$). Este es un evento temprano, considerando el curso de la enfermedad, que conduce a una disminución de las concentraciones de hierro y cobre en el cerebro (Nagano *et al.* 2004). Otros eventos patológicos asociados a la EA son, deposición de marañas neurofibrilares, muerte neuronal, angiopatía amiloide, atrofia, astrogliosis, activación de las células microgliales y daño oxidante (de Calignon *et al.* 2010; Kimura *et al.* 2010). Cada una de estas lesiones tiene una distribución característica en todo el manto cortical siendo por lo tanto, marcadores útiles para el diagnóstico de la misma (Wyss-Coray *et al.* 2012).

1.1.5.4 Acetilcolina

La mayor parte de la acetilcolina (ACh) del SNC, se sintetiza en el núcleo basal de Meynert por la acción de la colina-acetil-transferasa. En condiciones normales, este neurotransmisor lleva a cabo su acción en las uniones neuromusculares y en las uniones neuronales del SNC. Los receptores muscarínicos y nicotínicos para ACh, son los elementos responsables de las acciones post-sinápticas de este neurotransmisor (García *et al.* 2009; Serrano-Pozo *et al.* 2011).

Durante la EA, la producción de ACh disminuye de un 58 a 90%, correlacionando directamente con el deterioro cognoscitivo (García *et al.* 2009; Serrano-Pozo *et al.* 2011). Así mismo, de los cinco receptores muscarínicos

plenamente identificados, los M1 y M2 son los que tienen mayor participación en la fisiopatología de la enfermedad (Hardman *et al.* 2003).

La importancia de la señalización colinérgica en el proceso de aprendizaje y memoria, ha sido determinada a través del empleo de diversos antagonistas de la ACh. Por ejemplo, la administración de antagonistas selectivos para los receptores de este neurotransmisor como es la escopolamina (ESC), logra dañar la memoria espacial al reducir la liberación de ACh en el hipocampo (Tanaka *et al.* 1989; Auerbach *et al.* 1994). Finalmente, por medio de modelos computarizados se ha demostrado cómo el mecanismo celular de estos efectos, incrementan el proceso de codificación que genera la memoria (Mesulam, 2004).

1.1.5.5 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE), es la enzima encargada de terminar la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica, asegurando el bloqueo de la generación continua y descontrolada de los impulsos nerviosos en la neurona post-sináptica (Massoulie *et al.* 2009; Brunton *et al.* 2006). Esta actividad, es llevada a cabo a través de la hidrólisis del neurotransmisor ACh (Hardman *et al.* 2003).

De acuerdo a su función, la AChE ha sido clasificada como una esterasa de serina, perteneciente a la categoría de las hidrolasas. El análisis de su conformación espacial, ha mostrado que es una proteína globular, con forma elipsoidal y con una dimensión aproximada de 45 x 60 x 65 Å. (Sussman *et al.* 1991; Milkani *et al.* 2011).

La acción catalítica de la AChE se realiza a través de una reacción de dos pasos. En el primero de estos, se da la hidrólisis de la ACh a través de un residuo de serina presente en el centro activo de la AChE. Durante esta reacción, se da la formación de un subproducto intermedio de acetil-enzima y la liberación de colina (Massoulié *et al.* 2009; Silman *et al.* 2008). En el segundo paso, la acetil-enzima es hidrolizada, regenerándose la acetilcolinesterasa y liberando ácido acético. Una vez realizada la reacción, la colina puede regresar a la membrana pre-sináptica y ser reutilizada en la síntesis de ACh (Sussman *et al.* 1992; Milkani *et al.* 2011).

1.1.5.6 Neuroinflamación

El significado del término inflamación ha sufrido una considerable evolución, usualmente es definido por cuatro signos primordiales: tumor, rubor, calor y dolor. Otro aspecto característico, es la extravasación de células sanguíneas, principalmente granulocitos al principio y linfocitos después dentro de la zona de daño (Arnaíz-Villena *et al.* 1995; Goldsby *et al.* 2004).

Sin embargo, la palabra neuroinflamación se usa cada vez más para identificar un conjunto de condiciones específicas del sistema nervioso central (SNC) (Woodcock *et al.* 2013). Una característica distintiva de la neuroinflamación, es la participación exclusiva de células del SNC en el proceso. En este sentido, la activación de la microglía durante los procesos inflamatorios en el SNC ha sido bien

documentada (Gosselin *et al.* 2007). Por otro lado, a pesar de que la respuesta neuroinflamatoria se da como respuesta a agentes dañinos en condiciones patológicas, la activación crónica de ésta, puede ser perjudicial para la función neurológica normal. Esto último queda de manifiesto al determinarse que la proliferación y activación de la microglía ocurre en muchas enfermedades neurológicas (Aguzzi *et al.* 2013).

Dentro de las evidencias de una respuesta inflamatoria en la EA, se incluyen cambios en la morfología de la microglía y astrogliosis lo cual, se determina a través del incremento en el número, tamaño y motilidad de los astrocitos que rodean las placas seniles (Akiyama *et al.* 2000; Kitazawa *et al.* 2004). Por otra parte, se ha demostrado que los cambios mencionados, tras activar la microglía, inducen la producción de factores como el óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), citocinas pro inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), quimiocinas (IL-18), prostaglandinas (PGE2) y proteína C-reactiva (CRP). La falta de regulación en este proceso a través de la liberación de estos mediadores de manera crónica, como ha sido mencionado, es capaz de promover daño en el tejido neuronal, llevándolo inclusive a la muerte (Konsman *et al.* 2007; Gosselin *et al.* 2007).

Así mismo, se ha sugerido que, concentraciones elevadas de citocinas pro inflamatorias y CRP, podrían actuar a través de la vía paracrina y/o autocrina y estimular a las células gliales para producir A β 42 adicional y proteínas tau (Wys-

Coray *et al.* 2012; Kristofikova, 2013). De esta manera, la neuroinflamación en la EA establece un ciclo de reforzamiento en el cual, los mediadores inflamatorios juegan un papel dual. Por un lado, estimulan a las células gliales para la producción y liberación de mediadores inmunológicos y por el otro, activan la vía molecular para la acumulación de placas seniles y la formación de ovillos neurofibrilares (Kamer *et al.* 2008; Wys-Coray *et al.* 2012). En su conjunto, todos estos eventos favorecen la muerte neuronal y la neurodegeneración.

1.1.5.7 Tratamientos

Actualmente, la Food and Drug Administration (FDA) reconoce como medicamentos para el tratamiento de la EA a los inhibidores de la acción de la acetilcolinesterasa como la rivastigmina, donepezilo, y galantamina. La acción de estos, fármacos permite un incremento en las concentraciones del neurotransmisor acetilcolina y por lo tanto, favorecen el proceso de aprendizaje y memoria. A pesar de la eficacia de los compuestos mencionados en el combate de la EA, no dejan de ser evidentes sus efectos secundarios indeseables, entre los que destacan: vómitos, cefaleas, pérdida de peso o daño hepático en el caso de la tacrina (Gonzales, 2005; Darryl, 2005).

1.1.5.8 Comorbilidad

Como se ha mencionado anteriormente, los trastornos neurológicos son un grave problema de salud pública a nivel mundial, con un elevado costo social, afectando a las personas sin distinción de edad, sexo, nivel socio-económico o cultural y son responsables de cuatro de las seis causas principales de años vividos con discapacidad. En el 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó que 450 millones de personas en el mundo sufren de algún trastorno neurológico lo que representa un 12% del total de enfermedades prevalentes (OMS, 2009). Se estima que una de cada cuatro familias tiene por lo menos un miembro afectado por trastornos neurológicos como: depresión, ansiedad, esquizofrenia y demencias como la EA; todas ellas están relacionadas estrechamente con la degeneración progresiva del sistema límbico y las regiones neocorticales (Crews *et al.* 2010).

El tratamiento farmacológico actual para contrarrestar los síntomas asociados a los trastornos mentales, se basan en la prescripción de ansiolíticos como las benzodiazepinas (que actúan sobre el sistema GABAérgico), los antidepresivos como los Inhibidores Selectivos de la Recaptura a Serotonina (ISSR); para el caso de las enfermedades demenciales como la EA se administran nootrópicos, tales como los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (Melik *et al.* 2014;).

Estos fármacos de síntesis a pesar de su eficacia, a mediano y largo plazo inducen una disminución en la calidad de vida de los pacientes, debido a la manifestación de efectos indeseables como trastornos del sueño, pérdida de la

coordinación motriz, tolerancia y adicción a los ansiolíticos benzodiazepínicos; por otra parte la sedación, pérdida de peso y disfunción sexual, son efectos no deseables de los fármacos antidepresivos (Gonzales, 2005; Darryl, 2005).

1.2 *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlthd



Figura 1.- Ejemplar de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlthd

1.2.1 Clasificación taxonómica de *B. ternifolia*.

La clasificación taxonómica de *B. ternifolia* ha sido descrita como a continuación se enlista. Reino: Plantae; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Orden: Gentianales; Familia: Rubiaceae; Subfamilia: Rubioidae; Tribu: Spermacoceae; Género: *Bouvardia* y Especie: *Bouvardia ternifolia* (CONABIO 2009).

1.2.2 Descripción general de *B. ternifolia*.

B. ternifolia, es una planta herbácea con forma de arbusto, que puede alcanzar un tamaño de hasta 2 m de altura. Sus hojas son de forma lanceolada, sus flores de color rojizo en forma de trompeta, sus semillas tienen un tamaño de 2 a 3.5 mm de diámetro. Esta planta suele distribuirse en zonas de clima frío, a una altitud que va desde los 1200 hasta los 2600 metros sobre el nivel del mar (CONABIO, 2009).

1.2.3 Usos medicinales de *B. ternifolia*

Múltiples usos medicinales han sido atribuidos a *B. ternifolia*, de entre estos, se destacan sus efectos sobre el SNC al controlar desórdenes mentales y nervios, así como agente antiinflamatorio, al tratar infecciones generales. Otras actividades biológicas descritas son, el controlar problemas del sistema circulatorio y digestivos, problemas en el embarazo y parto, desórdenes del sistema respiratorio, envenenamientos y dolor, así como para la disentería, rabia, cólicos, diarrea y sangrado (Argueta *et al.* 1994). Así mismo, se usa como tónico cardíaco y sus hojas y flores son usadas para combatir la erisipela. En forma de cataplasma o ingerida como infusión es usada contra piquetes de insectos (planta completa o semilla) y finalmente, se usa contra el prurito hervida y en forma de té (Aguilar-Contreras, *et al.* 1998).

1.2.4 Estudios fitoquímicos de *B. ternifolia*

De las partes aéreas de esta planta se han aislado componentes peptídicos como el bouvardín (Jolad *et al.* 1977). De igual manera, se han reportado algunos compuestos derivados de esta molécula como el desoxi-boubardin y algunos derivados metilados (Shivanand *et al.* 1977). Por otro lado, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, han mostrado que en la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de esta planta, se encuentran el ácido ursólico y diversos flavonoides como: rutina, quercetina y Kaemferol (García-Morales, 2010; Herrera-Ruiz *et al.* 2012). Así mismo, en la raíz existe una elevada concentración del ácido ursólico y del ácido oleanólico (Pérez *et al.* 1998).

Es importante mencionar que la presencia de los flavonoides en *B. ternifolia*, les sugiere como moléculas responsables de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, sedantes, hepatoprotectoras y sobre todo de inhibición de la enzima AChE, previamente observadas (Chung *et al.* 2001; Jiménez-Ferrer *et al.* 2005).

1.2.5 Estudios farmacológicos de *B. ternifolia*

De acuerdo a trabajos realizados (García-Morales *et al.* 2008; García-Morales *et al.* 2010), *B. ternifolia* tiene un potente efecto inhibitorio sobre la AChE, y contribuye de manera importante a disminuir la inflamación. Así mismo, el extracto

hidroalcohólico de esta planta favorece la protección del sistema nervioso al tener un potente efecto nootrópico. Todos estos datos refuerzan la idea de que los metabolitos secundarios presentes en *B. ternifolia* podrían regular, procesos importantes para la protección contra la EA. De manera específica, el empleo de esta planta sería capaz de abatir la inflamación crónica del SNC e inhibir la actividad de la AChE manteniendo la disponibilidad de ACh en las hendiduras sinápticas. En conjunto, todos estos efectos biológicos colocan a *B. ternifolia* como una novedosa fuente de compuestos terapéuticos que ayuden al tratamiento de la EA.

1.2.6 Estudios toxicológicos de *B. ternifolia*

El compuesto aislado de *B. ternifolia* llamado Bouvardín (NSC 259968) (BVD) fue examinado por su efecto sobre la supervivencia y capacidad de inducir crecimiento de la población de células de la línea CHO de hámster chino. Las células redujeron su capacidad de atravesar el ciclo celular a concentraciones bajas de BVD (0,2 µg/ml), observándose inhibición completa a concentraciones superiores a 1,0 µg/ml. El análisis citométrico mostró que había muy poco reordenamiento de las células de todo el ciclo celular en cultivos tratados, lo que sugiere que BVD detuvo la progresión de células de manera uniforme a través de todo el ciclo celular. Con estos datos se llegó a la conclusión de que BVD estaba actuando como un inhibidor de la síntesis de proteínas. En vista de estas propiedades cinéticas y citotóxicas, se plantean cuestiones sobre el valor de BVD como un agente quimioterapéutico (Tobey *et al*, 1978).

El efecto citotóxico del BVD como un inhibidor de la síntesis de proteínas se estudió por separado y en combinación con verapamil (VRP), un vasodilatador e hipertermia (43 °C) contra el sarcoma 180 (S 18) y células tumorales del carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) in vitro. Las Células S 180 exhibieron resistencia natural a la hipertermia y al BVD, mientras que no se encontraron células tumorales sensibles a EAC. El VRP sólo, no mostró citotoxicidad a cualquiera de las células tumorales. La combinación de BVD, la hipertermia y la VRP se tradujo en una mayor muerte de células, en comparación con el tratamiento por separado con los agentes individuales. La citotoxicidad se evaluó mediante la comparación de la inhibición de la incorporación de 3H-timidina en las células tratadas contra células no tratadas con BVD (Chitnis *et al.* 1986).

Así mismo, la toxicidad de una mezcla de ácido ursólico y oleanólico obtenida de *B. ternifolia* fue evaluada en un ensayo de toxicidad subaguda en ratones Balb/C, los cuales fueron tratados con la mezcla antes mencionada a dosis de 6.5 y 13 mg/kg. Esta administración subaguda, no promovió la muerte de los ratones, alteraciones en su crecimiento o cambios en el peso de sus órganos. Finalmente, el análisis histopatológico de diversos órganos, no presentó cambios o anomalías en estos. En conclusión, la mezcla de ácido ursólico y oleanólico obtenidos de *B. ternifolia*, fue prácticamente inocua (Cornejo-Garrido *et al.* 2012).

2 Justificación

Aunado al incremento en el número de casos de trastornos neurológicos a nivel mundial y nacional de la ansiedad, depresión y demencias como la EA, el hecho de que los tratamientos actualmente utilizados para tratar estos padecimientos presenten diversos efectos secundario indeseables, permitió que el presente trabajo se enfocara a la búsqueda de un tratamiento derivado de plantas medicinales, que ayude a disminuir los síntomas asociados a los diferentes trastornos neurológicos como la pérdida de memoria, ansiedad, depresión, inflamación y daño oxidante, con la menor cantidad posible de efectos secundarios indeseables. Para llegar a esto se propuso trabajar con *B. ternifolia* en los modelos de evitación pasiva (memoria), Laberinto Elevado en Forma de Cruz (LEC; ansiedad), nado forzado (depresión), sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa *in vitro*, inflamación auricular inducida por 12-orto-tetradecanoil-phorbol-acetato (TPA), sustancias reactivas de ácido tiobarbiturico *in vitro* (TBARS; antioxidante) basados en sus propiedades biológicas reportadas y anteriormente mencionadas.

3 Pregunta de investigación

¿El extracto hidroalcohólico de *B. ternifolia* (BtHA) y sus fracciones tendrán la capacidad ejercer un efecto neuroprotector?

4 Hipótesis

Debido al uso etnomédico que se le atribuye a la especie *B. ternifolia* y los estudios farmacológicos descritos, BtHA y sus fracciones son capaces de contrarrestar trastornos del SNC como la pérdida de la memoria, ansiedad, depresión, así como eventos asociados a estos como son inflamación, estrés oxidante e inhibición de acetilcolinesterasa.

5 Objetivo general

- Evaluar el efecto neuroprotector del extracto *B. ternifolia* (BtHA) y sus fracciones en la memoria (nootropismo), ansiedad, depresión, actividad de la acetilcolinesterasa, inflamación y estrés oxidante.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto nootrópico, ansiolítico y antidepresivo del extracto hidroalcohólico de BtHA en ratones macho expuestos a diferentes pruebas: evitación pasiva, laberinto elevado en forma de cruz, campo abierto y natación forzada.
- Medir el efecto de BtHA y fracciones de ésta, en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, usando el ensayo *in vitro* de Ellman.
- Evaluar el efecto de BtHA y fracciones de la misma, en la inflamación local inducida con un éster de forbol en ratones machos y sobre la per-oxidación lipídica *in vitro* (estrés oxidante).
- Caracterizar químicamente la fracción que presente la mayor actividad contra la acetilcolinesterasa, inflamación y estrés oxidante, usando técnicas como cromatografía en placa, en columna y de alta resolución.

6 Materiales y métodos

6.1 Animales

Se usaron ratones albinos machos de la cepa ICR (Institute of Cancer Research) con un promedio de peso de 30 g y ratas hembra de la cepa Sprague Dawley con un peso promedio de 300 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio, durante dos semanas a 25 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, con acceso libre a agua y alimento.

Todos los animales empleados en el presente proyecto fueron manipulados bajo la ética de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de los animales de laboratorio). El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro R-2010-1701-57.

6.2 Obtención del extracto hidroalcohólico de *B. ternifolia* (BtHA)

Se colectaron partes aéreas (flor, fruto, hoja y tallo) de *B. ternifolia* en la comunidad de Coajomulco municipio de Huitzilac en el estado de Morelos, México, entre los meses de julio y agosto. El material vegetal colectado, fue secado en un cuarto oscuro a temperatura ambiente ($32\text{ °C} \pm 2$), una vez seco, el material vegetal fue pesado (1700 g), molido y posteriormente macerado con etanol al 60 % durante tres días. El extracto obtenido de cada día fue concentrado en un evaporador

rotatorio (HEIDOLPH, Schwabach, Alemania), liofilizado y etiquetado como BtHA (Herrera-Ruiz *et al.* 2012).

6.2.1 Análisis químico de BtHA

Se utilizó un equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para la detección y cuantificación de los compuestos mayoritarios presentes en BtHA. El equipo consta de un módulo de separación (Waters® 2695) equipado con un detector de arreglo de diodos (Waters® 2996) y operado con un software Empower 1. Se empleó una columna Superspher® 100 RP-18 (120 x 4 mm; 5µm, Merck), utilizando como fase móvil agua/ácido acético al 1 % como solvente A (OMNISOLV, EMD) y acetonitrilo como solvente B (OMNISOLV, EMD), con un flujo de 1 mL/ min y utilizando un sistema de gradiente durante 20 min de corrida de muestra, el cual estuvo compuesto de la siguiente manera: el solvente A durante los primeros dos minutos se mantuvo al 100 %, al minuto 3 se disminuyó hasta alcanzar el 85 %, al minuto 7 se llevó al 72 %, manteniendo esa concentración hasta el minuto 12, durante los siguientes dos minutos la mezcla contenía el 30 % del solvente A, al minuto 15 se realizó un cambio en el gradiente de concentración que llegó a 100 % del solvente B, el cual se mantuvo durante un minuto y finalmente del minuto 17 al 20 el gradiente regresó a las condiciones iniciales en donde el solvente A es 100 %.

La longitud de onda a la que se monitorearon las muestras fue de 200-600 nm y el volumen de inyección fue 20 μ l. La cuantificación de los compuestos se realizó usando curvas de calibración construidas con estándares comerciales (SIGMA, ALDRICH, USA) de rutina, ácido ursólico (Herrera-Ruiz *et al.*, 2012), glucósido de quercetina, ácido clorogénico y escopoletina.

6.3 Fraccionamiento de BtHA

Con la finalidad de obtener una fracción que demostrara tener actividad anti-acetilcolinesterasa, anti-inflamatoria y antioxidante, se realizaron dos métodos de fraccionamiento de BtHA.

En el primero, se realizó el fraccionamiento de BtHA por bipartición (Figura 2), para separar sus componentes químicos por polaridad (Herrera-Ruiz *et al.* 2012). Para esto, se empleó una mezcla de acetato de etilo (AcOEt grado reactivo, Merck, Damstadt, Alemania) y H₂O en una proporción 1:1. La fase de acetato de etilo fue recuperada, concentrada, liofilizada y almacenada para ser usada posteriormente en las pruebas biológicas (Fr-AcOEt). La fase acuosa obtenida a partir de la bipartición, fue re-suspendida en metanol (MeOH grado reactivo, Merck). Como resultado de esta resuspensión se obtuvieron dos fracciones, Fr-MeOH (sobrenadante) y Fr-PP (precipitado).

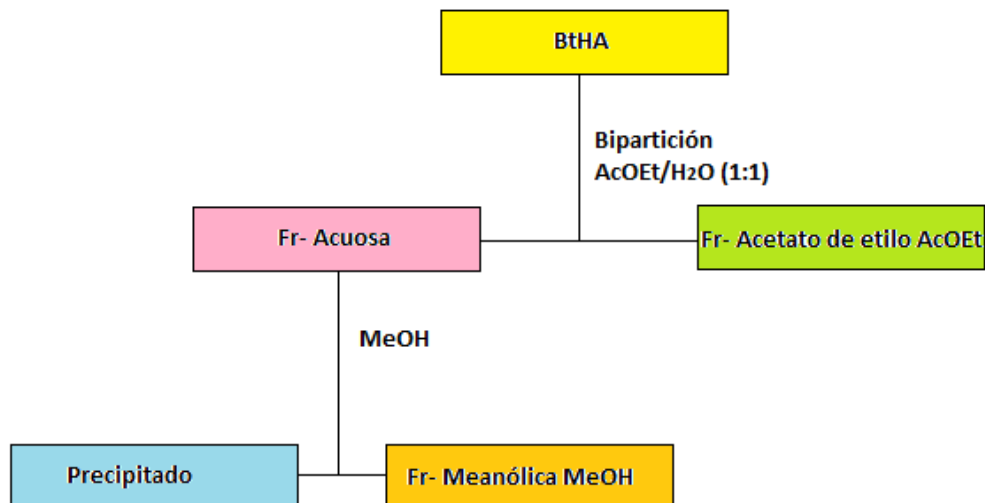


Figura 2.- Esquema del primer fraccionamiento de BtHA por bipartición con AcOEt/H₂O (1:1)

En el segundo fraccionamiento (Figura 3), BtHA fue disuelto con MeOH al 60 % y centrifugado a 3,000 rpm durante 50 min a 25 °C. El precipitado obtenido fue fraccionado, utilizando una cromatografía en columna, con Diaion HP20 (SIGMA Saint Louis, U.S.A.) como fase estacionaria. Como fase móvil, se empleó MeOH al 60 % y 100 % así como, AcOEt al 100 %. Las fracciones obtenidas de este fraccionamiento fueron etiquetadas como Fr-1, Fr-2 y Fr-3 con respecto al orden de polaridad en que se obtuvieron.

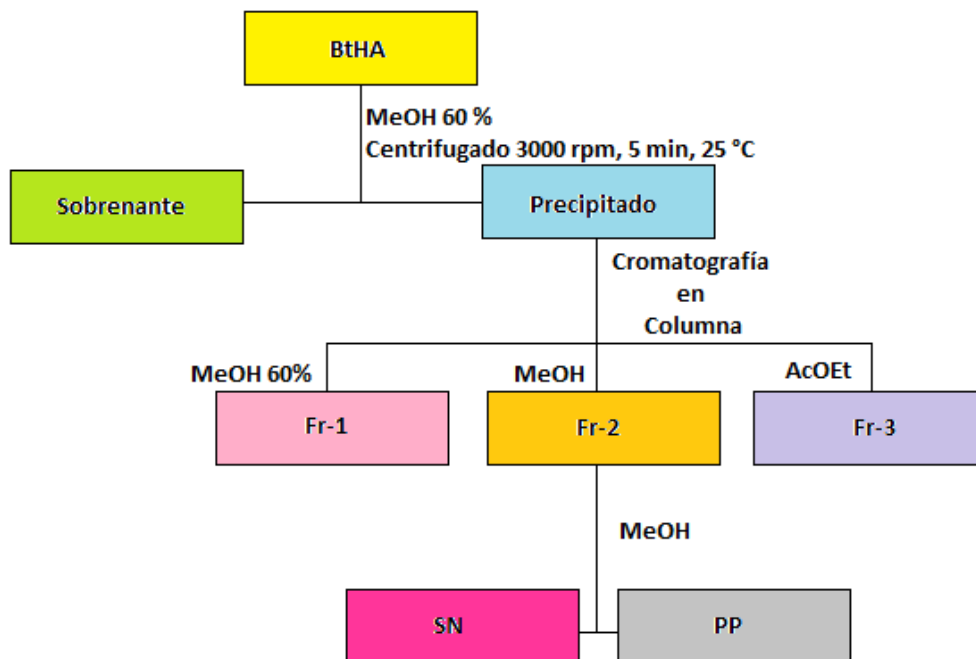


Figura 3.- Esquema del segundo fraccionamiento de BtHA por centrifugación y cromatografía en columna.

6.3.1 Análisis químico de las fracciones obtenidas de BtHA

Para el análisis químico por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de BtHA y sus fracciones (Fr-AcOEt, MeOH, PP, Fr-1, Fr-2 y Fr-3), se empleó una columna Superspher® 100 RP-18 (120 x 4 mm; 5µm, Merck) y un sistema de elución H₂O (solvente A), Acetonitrilo (Grado HPLC, Merck) (Solvente B) con un flujo de 1 ml/min y una presión de 700-1600 psi, a una $\lambda=205$ nm. El sistema de gradiente fue: A %: B %= 100:0 (0-1min); 90:10 (2-4 min); 80:20(5-9 min); 70 % (10-15 min); 60:40 (16-18 min); 40:60 (19-20 min); 0:100 (21-30 min); 100:0 (31-32 min).

6.4 Fraccionamiento de Fr-AcOEt

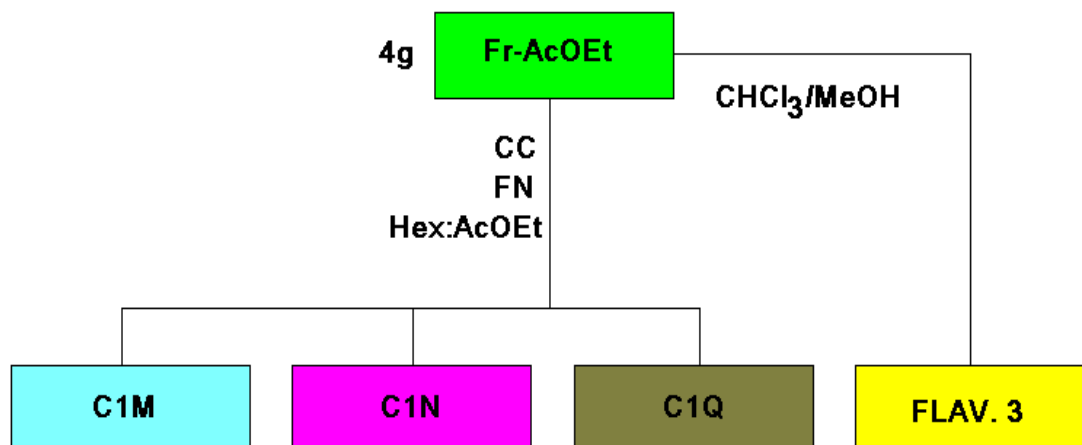


Figura 4.- Fraccionamiento de Fr-AcOEt de donde se obtuvieron las fracciones con mayor polaridad que el ácido ursólico (C1M, C1N, C1Q), y la fracción rica en flavonoides (Flav. 3).

Este fraccionamiento (Figura 4) se llevó a cabo a través de una cromatografía en columna de fase normal, utilizando como fase estacionaria, sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck) de fase normal y como fase móvil n-hexano: AcOEt (n-hexano grado reactivo, Merck). En este proceso se utilizó Fr-AcOEt obtenida de la bipartición de BtHA y se colectaron fracciones que contenían compuestos con una polaridad mayor al ácido ursólico, estas nuevas fracciones fueron denominadas C1M, C1N y C1Q. Cabe mencionar que con una parte de Fr-AcOEt, se hizo una re-suspensión con cloroformo (CHCl₃)/MeOH (tres veces) obteniéndose así un precipitado rico en flavonoides, el cual fue denominado Flav 3. Todas las fracciones fueron liofilizadas y evaluadas en los modelos de inhibición enzimática, inflamación y antioxidante, que son descritos más adelante.

6.4.1 Análisis químico del fraccionamiento de Fr-AcOEt

El análisis químico por HPLC de las fracciones de Fr-AcOEt (C1M , C1N , C1Q) y la fracción rica en flavonoides (Flav3) se llevó a cabo utilizando una columna Superspher® 100 RP-18 (120 x 4 mm; 5µm, Merck), con las siguientes proporciones de disolventes: para la fase móvil el disolvente A fue H₂O y el disolvente B fue acetonitrilo: A: B = 100: 0 (0-1 min), 90:10 (2-4 min), 80:20 (min 5-7), 75:20 (8-11 min), 60:40 (12-14 min); 20: 80 (15-16 min); 0:100 (17-18 min) y 100:0 (19-22 min).

El volumen de inyección de muestra fue de 20 µl con una velocidad de flujo 1ml/min durante 22 minutos. La longitud de onda de detección fue escaneada a 190-400 nm. La cuantificación de los compuestos principales se logró utilizando curvas de calibración que se construyeron por separado con los estándares puros de los flavonoides observados (SIGMA) (Herrera-Ruiz *et al.*, 2012).

6.5 Modelos Biológicos

6.5.1 Paradigma de Evitación Pasiva (PEP)

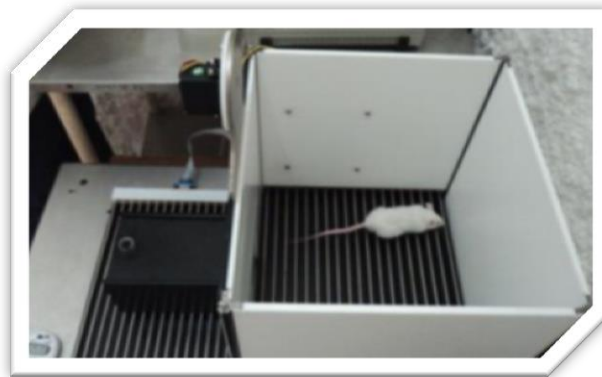


Figura 5.- Dispositivo de Paradigma de Evitación Pasiva, empleado para explorar memoria a corto y largo plazo.

El paradigma de evitación pasiva se usa tradicionalmente como una manera rápida y fácil de explorar la memoria a corto y a largo plazo. Esta prueba induce en el roedor un conflicto entre la preferencia innata por las zonas oscuras y la aversión por zonas iluminadas.

En este modelo se utiliza un dispositivo constituido por dos compartimientos, uno descubierto e iluminado y otro cerrado y oscuro, separadas entre sí, por una puerta en forma de guillotina; la base del dispositivo es una rejilla metálica que se conecta a una fuente eléctrica, la cual es controlada manualmente (Panlab Cornella, modelo LE872).

La prueba consta de dos fases: la primera es de entrenamiento y adquisición con una duración de dos días, esta fase consiste en colocar al ratón en el compartimiento iluminado del dispositivo orientado de frente al compartimiento

oscuro; en el primer día el ratón explora el dispositivo durante 30 seg y después se abre la puerta que separa ambos compartimientos. Una vez que el ratón entra en el compartimiento oscuro, la puerta se cierra automáticamente y se aplica una descarga eléctrica de 0.6 mA durante 2 seg (Ent). En el segundo día los animales son expuestos al dispositivo y se evalúa la adquisición del aprendizaje (Adq).

Todos los ratones entrenados fueron asignados al azar, en grupos de 7 individuos para su tratamiento: BASAL, BtHA (50, 100, 200 y 500 mg/kg), Galantamina (GAL) 4 mg/kg y Vehículo (VEH). Inmediatamente después de evaluar la adquisición, los tratamientos fueron administrados cada 24 horas durante 4 días consecutivos; el grupo control BASAL y el grupo VEH solo recibieron H₂O.

En la segunda fase (retención de memoria) se administraron los tratamientos BtHA, GAL y VEH vía oral (vo) 1 h antes de la evaluación final. Treinta minutos después de la aplicación del tratamiento, se les administró 2 mg/kg de ESC (fármaco inductor de deterioro temporal de la memoria) vía intraperitoneal (ip) y treinta minutos más tarde, se evaluó la retención de memoria de todos los tratamientos (incluyendo el BASAL y VEH) colocando a los ratones en el dispositivo de Evitación Pasiva, sin estímulo eléctrico. El parámetro indicativo de una retención de la memoria, fue el tiempo (seg) de latencia de escape del compartimiento iluminado al compartimiento oscuro.

6.5.2 Natación forzada (NF)



Figura 6.- Prueba de Natación forzada, utilizado para medir depresión.

La prueba se lleva a cabo en un cilindro de vidrio de 20 cm de alto x 12 cm de diámetro, con agua hasta los 16 cm de altura, a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. Los ratones inicialmente, son sometidos a una pre-prueba de nado de 15 minutos duración, posteriormente son retirados del agua, secados y puestos a resguardo en grupos de 7 individuos.

Después de la pre-prueba, se inició un esquema de administración (vo) de los tratamientos de BtHA (50, 100, 200 y 500 mg/kg), VHE y un antidepresivo comercial (imipramina) a 15 mg/kg (IMI), 24, 18 y 1 h antes de la evaluación final.

Durante la prueba final, se midió el tiempo de inmovilidad de los ratones en un lapso de 5 minutos. La finalidad de esta prueba es inducir desesperanza conductual aprendida en los ratones, que se refleja como una disminución del tiempo de movilidad, hecho que a su vez, es traducido como depresión.

6.5.3 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)



Figura 7.- Laberinto Elevado en forma de Cruz, modelo empleado para medir ansiedad.

El LEC es un dispositivo que por sí mismo, genera estados de ansiedad en los ratones evaluados, pues permite provocar en ellos la sensación de miedo al explorar espacios desprovistos de paredes y en condiciones de luz roja, que es total oscuridad para ellos. El aparato fue construido con acrílico transparente y consiste en dos brazos abiertos (30 cm x 5 cm) y dos brazos cerrados (30 cm x 5 cm x 15 cm) como se observa en la figura 7. Los brazos están extendidos desde una plataforma central (5 cm x 5 cm) y el laberinto se eleva 50 cm desde el suelo.

Para este ensayo se formaron grupos de 7 ratones, los cuales fueron administrados (vo) con las diferentes dosis de BtHA (50, 100, 200 y 500 mg/kg) y VEH una hora antes de realizar el experimento. El Diazepam (DZP) se administró a 1 mg/kg (ip) 30 minutos antes de experimento. Cada animal fue colocado en el centro del laberinto frente a uno de los brazos abiertos.

El número de entradas y el tiempo que permanecen en los brazos abiertos y cerrados fueron registrados durante 5 min. La entrada hacia un brazo se definió cuando el animal colocaba las cuatro patas dentro de cualquiera de los brazos.

Todas las pruebas fueron grabadas con una cámara de video (SONY Handycam DCR-SR47). Después de cada prueba, el laberinto es aseado cuidadosamente con papel de seda, humedecido con una solución de etanol al 10 %. Se registró el porcentaje de número de entradas a los brazos abiertos (% NA) y el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (% TA). Un porcentaje alto de NA y TA con respecto al grupo VEH, es indicativo de un efecto ansiolítico.

6.5.4 Campo Abierto (CA)



Figura 8.- Modelo de Campo Abierto, este modelo se usa para medir la actividad motora espontánea.

El CA se utiliza para descartar un posible efecto sedante o sobre excitación general del SNC de los ratones evaluados en LEC. Para esto la actividad ambulatoria

de los roedores tratados fue comparada con la observada en el grupo que solo recibió VEH.

El piso de CA fue construido con acrílico negro, éste se encuentra dividido en nueve cuadrantes de 100 cm² cada uno (figura 8), las paredes son de acrílico transparente (30 cm x 30 cm x 15 cm). Los parámetros evaluados fueron el número de cuadrantes cruzados con las cuatro patas y el número de levantamientos verticales.

6.5.5 Análisis estadístico

Los resultados de estos modelos biológicos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE) y se analizaron usando análisis de varianza de una vía (ANOVA) y post-prueba de Dunnet, marcando diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$, usando el programa de software SPSS versión 11.0.

6.5.6 Evaluación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa *in vitro*



Figura 9.- Celda de cuarzo utilizada para medir la actividad de la enzima AChE.

El efecto de las fracciones de BtHA sobre la actividad de la enzima AChE, fue evaluada a través de ensayos *in vitro*. Para esto, se utilizó extracto de cerebro de ratón como fuente enzimática. A continuación se describe el método empleado para este propósito:

Siete ratones macho de la cepa ICR (HARLAN) fueron sacrificados por dislocación cervical. El cerebro de los animales mencionados fue disectado y congelado a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al cabo de 1 hora, los cerebros fueron descongelados y molidos con ayuda de un homogenizador tipo Potter (Kimble Chase, Vineland, U.S.A.) en 5 ml de PBS (NaCl 0.137 M, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 0.01 M, KH_2PO_4 1.4 Mm, pH: 7.2) adicionado con inhibidores de proteasas (Termolisina 0.0005mg/ml, Quimotripsina 0.002 mg/ml, Tripsina 0.02 mg/ml, Papaina 0.33 mg/ml) (Complete Mini EDTA-Free, ROCHE, Mannheim, Alemania). El homogenizado fue centrifugado a 13000 rpm durante 15 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante obtenido fue utilizado en los ensayos enzimáticos.

La evaluación de la actividad de la AChE se realizó siguiendo el método propuesto por Ellman *et al* en 1961, el cual se describe de la siguiente manera:

Para alcanzar un volumen final de 360 μ l, se agregaron a una celda de cuarzo (figura 9) 300 μ l de Buffer fosfatos (100 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 8), 20 μ l de ioduro de acetilcolina como sustrato (ATChI, SIGMA) a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 75 mM, 20 μ l de 10 mM de Dithio-bis-nitro-benzoato (DTNB, SIGMA). La mezcla fue mantenida a 36.5 $^{\circ}\text{C}$.

Para iniciar la reacción enzimática se agregaron 20 μ l de extracto de cerebro de ratón como fuente enzimática.

Se cuantificó la absorbancia de la reacción en un espectrofotómetro (PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS, Waltham, U.S.A.) a una longitud de onda de 412 nm cada 20 seg durante 3 min.

Para el ensayo de inhibición se agregaron 20 μ l de BtHA a concentraciones de 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml. Con estos datos se construyó una curva de inhibición la cual permitió calcular la IC50 (Anexo 1).

Las fracciones de BtHA obtenidas y las obtenidas del fraccionamiento de Fr-AcOEt, se evaluaron con la IC₅₀ (0.04 mg/ml) obtenida de BtHA y el valor de Km (1.86 mM) de la reacción enzimática sin inhibidor (Anexos 2 y 3), los resultados fueron comparados con los obtenidos de la adición de Tacrina (9-Amino-1, 2, 3,4-tetrahydroacridine hydrochloridehydrate, SIGMA), que es un inhibidor competitivo, a una concentración de 1×10^{-5} M. Con los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico con una ANOVA y una post-prueba de Tukey con $p < 0.05$. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición enzimática de cada uno de los tratamientos.

6.5.7 Inflamación inducida por TPA (12-orto-tetradecanoil-forbol 13-acetato)



Figura 10.- Ratón macho, tratado con éster de forbol para determinar el efecto anti-inflamatorio de BtHA y sus fracciones.

Esta técnica permitió evaluar el efecto antiinflamatorio de las diferentes fracciones de BtHA, mediante la determinación del diferencial de peso entre un pabellón auricular tratado con el agente antiinflamatorio y otro que no recibió tratamiento alguno (Young *et al.* 1989).

Siguiendo el protocolo propuesto por Young y De Young (1989), se evaluó el efecto antiinflamatorio de las fracciones de BtHA y de las fracciones de Fr-AcOEt. Todas las fracciones fueron administradas a una sola concentración (320 mg/ml) (García-Morales, 2008). Los tratamientos, así como el control positivo dexametasona (anti-inflamatorio comercial), fueron aplicados en la cara externa (10 µl) e interna (10 µl) del pabellón auricular derecho de los ratones. Al cabo de 15 min, se aplicó el agente proinflamatorio TPA (12-Orto-tetradecanoylphorbol-13-acetato, SIGMA, Saint Louis, U.S.A.) de la misma forma que los tratamientos, a una concentración de 0.25 mg/ml. Después de 24 horas de la aplicación del TPA, se aplicó nuevamente el proinflamatorio y una hora después, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

De cada uno de los animales experimentales, se obtuvieron secciones centrales de pabellón auricular de 6 mm de diámetro de la oreja tratada y la no tratada (figura 10). La actividad anti-inflamatoria de los tratamientos se determinó a través de la diferencia de peso entre ambas secciones de pabellón auricular. Los resultados fueron analizados con una ANOVA y una post-prueba de Tukey y una $p < 0.05$ para determinar las diferencias estadísticas de cada tratamiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antiinflamatoria.

6.5.8 Actividad antioxidante por el método de TBARS (Especies Reactivas de Ácido Tiobarbiturico).

El efecto antioxidante de las fracciones de BtHA fue determinado a través del método de TBARS. Este método es el más simple y popular para cuantificar la per-oxidación de lípidos en muestras biológicas (Lee *et al.* 2012). Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos, incluyendo compuestos carbonílicos reactivos (Sanderson *et al.* 1995; Nacitarhan *et al.* 1995). El malondialdehído (MDA) es un producto derivado del ácido araquidónico y es el producto final de la per-oxidación lipídica. Actualmente este método está siendo utilizado como indicador del estrés oxidante en los sistemas biológicos (Yagi, 1998).

El ensayo se basa en la reacción de ácido tiobarbiturico (TBA) con MDA para producir un color rosa (MDA-(TBA₂). El principio básico involucra el calentamiento de la muestra a alta temperatura (95-100 °C) con TBA bajo condiciones ácidas para permitir la formación de MDA-(TBA₂). El complejo MDA-(TBA₂) puede ser medido de forma colorimétrica por un espectrofotómetro con una absorbancia de 530-540 nm o fluorométricamente, usando una longitud de onda de excitación de 525 nm y emisión de onda de 547 nm (Gutteridge, 1986).

Para este estudio, se sacrificaron ratas por dislocación cervical, con la finalidad de extraer el cerebro, el cual, se usó como sustrato de lípidos de

membrana. El cerebro completo se colocó en solución salina fría a 0.9 %. Se pesó el cerebro y agregó 10 ml de buffer de fosfatos (9.5 mM, pH= 7.4) por cada gramo de cerebro. Se homogenizó por 60 s y posteriormente fue centrifugado por 10 min a 3000 rpm. Del sobrenadante obtenido, se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (Bio-Rad, Berkeley, California, U.S.A.). La inducción del estrés oxidante se promovió al agregar 10 μM de FeSO_4 (SIGMA) a 375 μl de sobrenadante (2.666 mg prot/ml) en tubos de 1.5 ml.

Posteriormente a todos los tubos se agregaron, 50 μl de PBS con 20 μM de EDTA (SIGMA) y se adicionaron 25 μl de las muestras. Se incubaron por 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se agregaron 50 μl de FeSO_4 (100 μM). Nuevamente se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$, con agitación durante 1 hora. Al término de este tiempo, se agregaron 500 μl de reactivo TBA (Ácido Tiobarbiturico, BioAssaySystems, Hayward, U.S.A.) y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Enseguida se centrifugaron las muestras durante 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, al finalizar se incubaron por 30 min en agua a 80 $^{\circ}\text{C}$. Por duplicado, se tomaron 200 μl de cada tubo y se colocaron en una placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia a 540 nm e interpolaron los valores en la curva estándar para obtener la concentración de TBARS en solución.

$$TBARS (\mu M) = \frac{A_{540nm} + 0.00877}{0.07558}$$

Los datos que se obtuvieron de con esta evaluación se reportaron como porcentaje de actividad antioxidante.

7 Resultados y discusión

7.1 Rendimientos de BtHA y análisis por HPLC

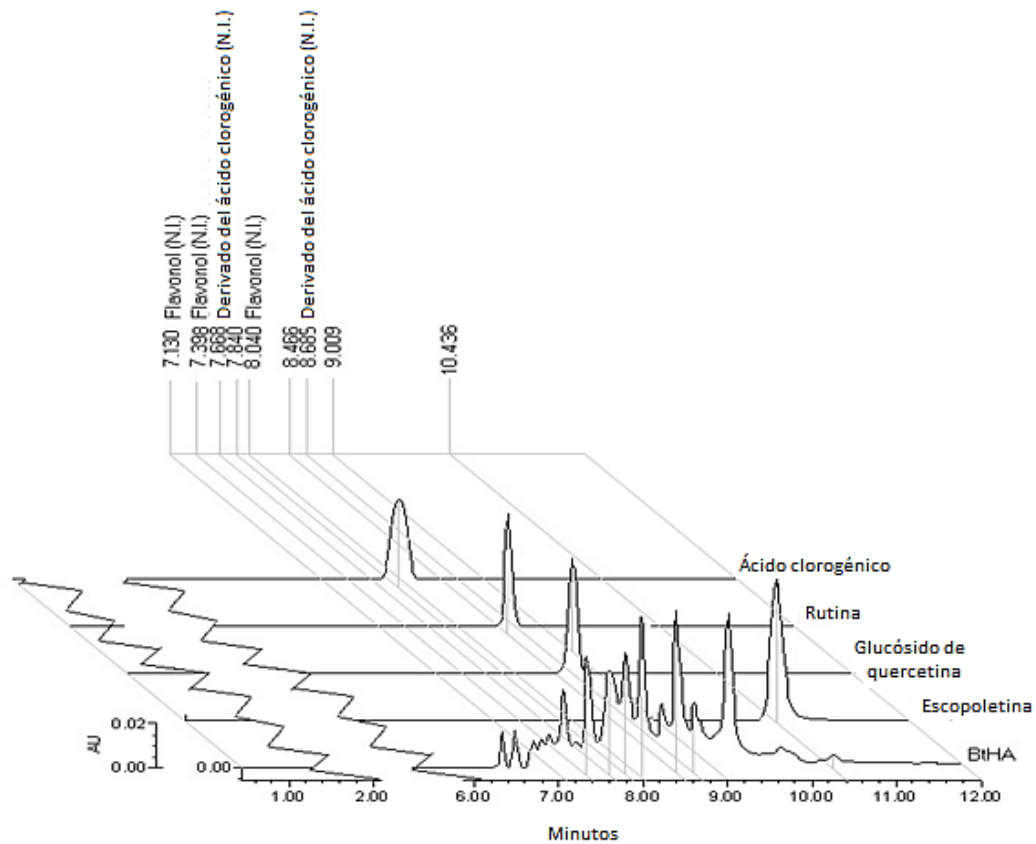


Figura 11.- Análisis cromatográfico por HPLC de BtHA a 350 nm.

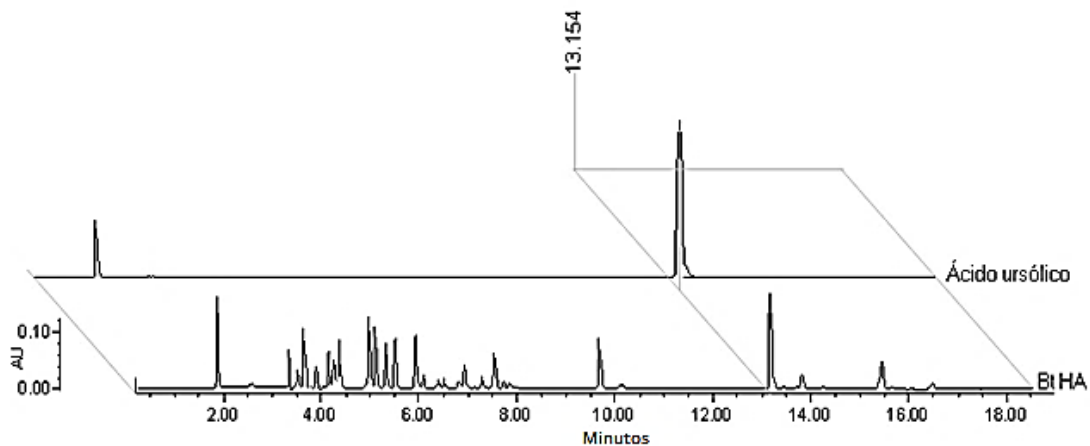


Figura 12.- Análisis cromatográfico por HPLC de BtHA a 210 nm.

Del proceso de extracción se obtuvieron 118 g en peso seco de BtHA, que representó el 14.35 % de rendimiento respecto del material vegetal inicial. El análisis

químico de BtHA a través de HPLC nos permitió identificar cinco compuestos: glucósido de quercetina, rutina, ácido ursólico, escopoletina, y ácido clorogénico mostrados en la figura 11 y 12.

La Tabla 1 muestra el análisis cuantitativo de los compuestos anteriormente mencionados, detectados en BtHA, así como sus tiempos de retención (T_R) y sus longitudes de onda (λ) inicial, máxima y final.

Tabla 1. Concentración de glucósido de quercetina, escopoletina, ácido ursólico y ácido clorogénico en BtHA.

COMPUESTO	T_R (min)	CONCENTRACIÓN (mg/g de extracto)	λ (nm)		
			A	B	C
Flavonoles					
Glucósido de quercetina	9.01	9.73	254	350	453
Rutina	8.46	NI	205	255	355
Flavonol	8.03	NI	255	355	448
Flavonol	7.39	NI	254	354	442
Flavonol	7.12	NI	212	267	300
Terpeno					
Ácido ursólico	13.15	15.73	190	205	266
Cumarina					
Escopoletina	10.43	3.23	297	350	420
Fenilpropanoides					
Ácido clorogénico	7.66	0.16	243	327	416
Derivado de Ac. clorogénico	7.81	NI	245	330	419
Derivado de Ac. clorogénico	8.68	NI	200	227	267

NI= no identificado; T_R = tiempo de retención; λ =longitud de onda A=inicial, B=máximo, C= final.

7.1.2 Efecto de BtHA en el paradigma de evitación pasiva (PEP)

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos del paradigma de evitación pasiva. Durante la fase 1 de entrenamiento (Ent, día 1), el promedio de tiempo que los animales tardaron en cruzar del compartimiento iluminado al oscuro donde recibieron la descarga eléctrica, fue de 22 seg. Durante la adquisición (Adq, día 2), el tiempo que tardaron en cruzar hacia compartimiento oscuro, se incrementó significativamente hasta 450 seg, resultado que fue interpretado como aprendizaje.

En la fase 2, el grupo de animales que recibió VEH (vo) y ESC (2.0 mg/kg ip), presentaron un tiempo de latencia de retención de memoria de 30 seg, que fue significativamente menor (*p <0.05) respecto del grupo BASAL (441 seg). El efecto de la ESC fue bloqueado por la administración de GAL (4.0 mg/kg), la cual indujo un incremento significativo (415 seg) respecto al VEH (*p <0.05) en el parámetro de tiempo de retención pero estadísticamente igual al grupo BASAL (p >0.05).

Los grupos de animales que recibieron durante 4 días, las dosis de 50, 100, 200 y 500 mg/kg de BtHA, mostraron un bloqueo del efecto de ESC al incrementar la latencia de retención de memoria de manera dependiente de la dosis, alcanzando valores de 200, 341 y 464 seg, respectivamente. Estos datos fueron significativamente diferentes al grupo VEH tratado con ESC (*p <0.05) por lo tanto se

determinó que BtHA muestra. La dosis menor (50 mg/kg) no indujo cambios respecto al grupo VEH ($p > 0.05$).

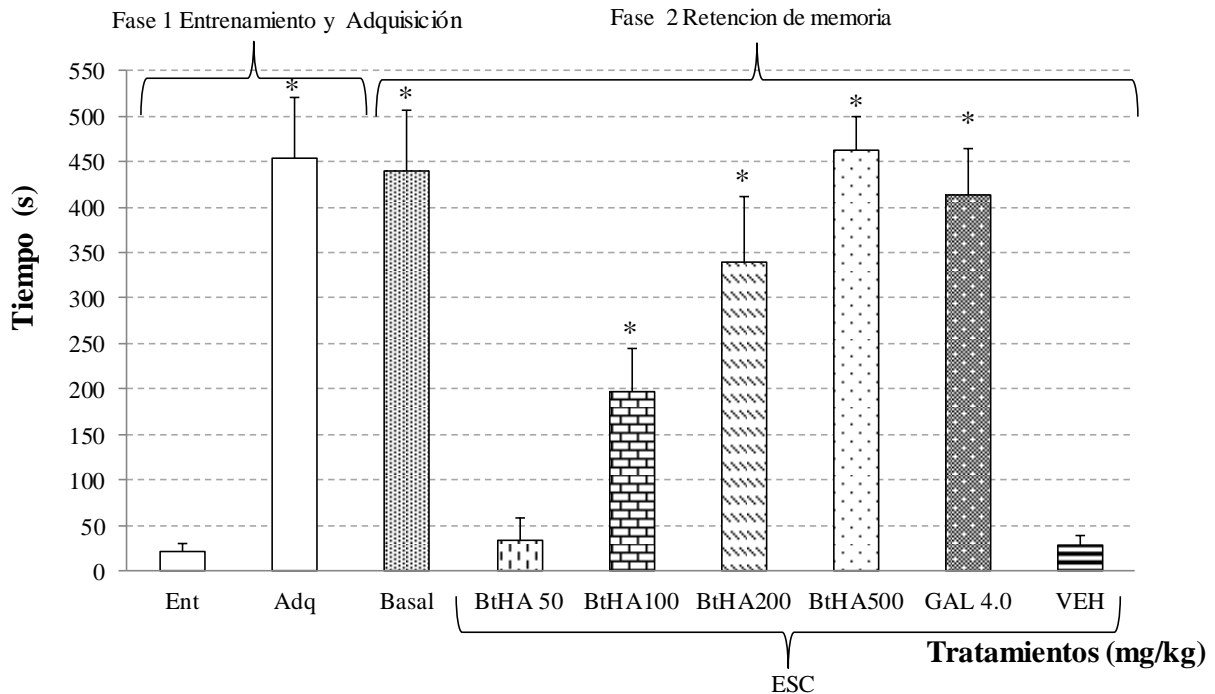


Figura 13.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA en el parámetro de retención de la memoria en ratones con daño inducido con ESC, en el modelo de PEP. GAL= Galantamina; VEH= control negativo; Ent= entrenamiento día uno; Adq= Adquisición día dos; BASAL= retención de la memoria al final del ensayo. Anova post-prueba de Dunnet se muestra el promedio \pm DE ($n= 7$).

La escopolamina se ha establecido como un medicamento amnésico que es utilizado como un modelo para inducir déficit de memoria (Norman *et al.* 2002). Este fármaco es un antagonista muscarínico de la ACh ya que inhibe los efectos de este neurotransmisor bloqueando sus sitios de unión, generando una depresión del sistema nervioso central, provocando estados de somnolencia, euforia, amnesia y fatiga.

Una posible respuesta al efecto nootrópico de BtHA es que al inhibir la actividad de la AChE en el cerebro de los ratones tratados con escopolamina, BtHA permite mantener la biodisponibilidad del neurotransmisor ACh y superar las concentraciones de la ESC administrada, ya que cabe la posibilidad de este fármaco no estar ocupando todos los receptores muscarínicos y por lo tanto la ACh tiene mayores posibilidades de unirse a receptores muscarínicos disponibles y de esta forma revertir el efecto amnésico de la ESC.

Como ya se ha mencionado, entre los compuestos de BtHA está presente el ácido ursólico, el cual ha sido reportado con actividad anti-acetilcolinesterasa (Chung *et al.* 2001) y este podría ser el compuesto responsable de la actividad biológica.

Otra posibilidad de respuesta al efecto nootrópico de BtHA se basa en los tipos de receptores del neurotransmisor ACh, el cual no solamente se une a los receptores muscarínicos sino que además se une a los receptores nicotínicos (Flores *et al.* 2005) por lo tanto, cabe la posibilidad que al haber una mayor biodisponibilidad de ACh, esta no solamente se una a los receptores muscarínicos disponibles, sino que además, podría estar uniéndose a los receptores nicotínicos, incrementando así la posibilidad de revertir el efecto de la ESC.

7.1.3 Efecto de BtHA en la prueba de natación forzada (NF)

En la figura 14 se observa que el grupo control negativo, que corresponde a los animales que sólo recibieron VEH presentaron un tiempo de inmovilidad de 261 seg. Mientras que la administración del antidepresivo IMI, produjo en los ratones una disminución de este parámetro hasta 75 seg, lo cual fue significativamente diferente ($*p < 0.05$) al VEH. Por otro lado, la administración de las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de BtHA produjeron en los animales experimentales, un comportamiento semejante ($p > 0.05$) al del grupo VEH con tiempos de inmovilidad de 255, 243 y 240 seg, respectivamente. Sin embargo, la administración de la dosis de 500 mg/kg provocó una disminución significativa en el tiempo de inmovilidad de los ratones en el cilindro con agua ($p < 0.05$), con un valor de 150 seg.

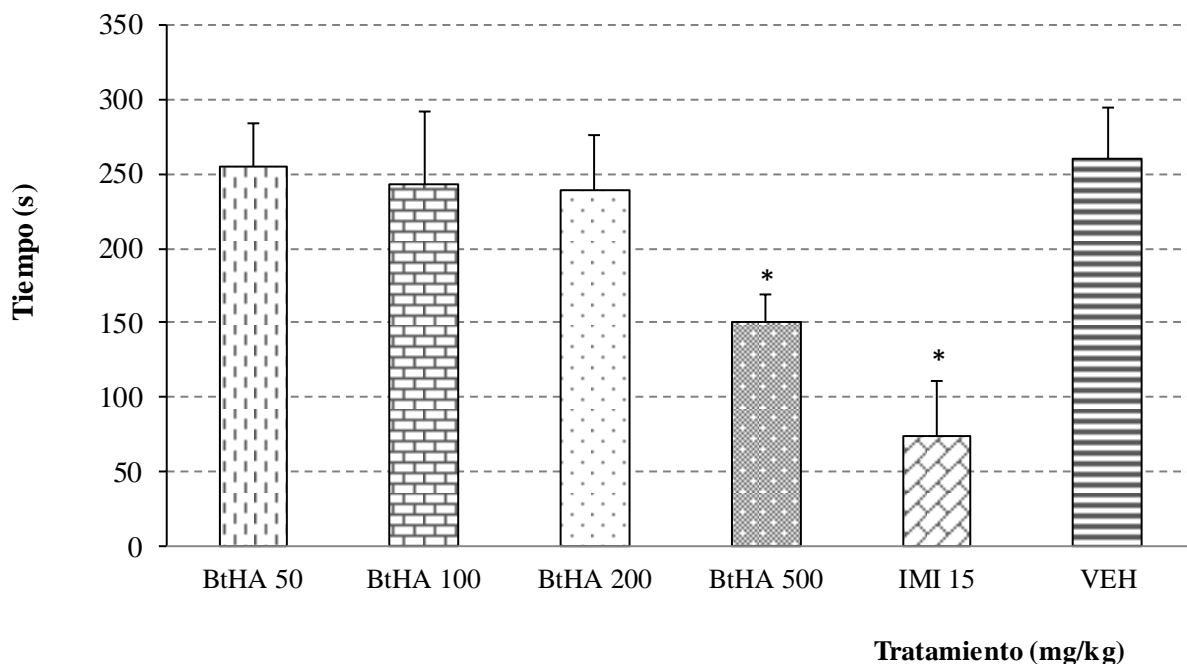


Figura 14.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA, sobre el tiempo de inmovilidad de los ratones en la prueba de NF. IMI=imipramina; VEH= control negativo. Anova *post-prueba* de Dunnet se muestra el promedio \pm DE (n= 7).

La prueba de NF, es una estrategia experimental que goza de alta popularidad para la búsqueda de tratamientos contra la depresión. Se basa en que la inmovilidad observada en los ratones sometidos a esta prueba, es reflejo de algunos aspectos de la depresión, como la desesperanza, la cual es disminuida con la administración de antidepresivos clásicos usados en la clínica (David *et al.* 2003). En este modelo se observó que BtHA es capaz de disminuir la inmovilidad de los ratones en el cilindro con agua, sólo a la dosis más alta administrada (500 mg/kg), dosis menores no tienen influencia sobre dicho parámetro.

Por otro lado, en los ensayos de NF se considera necesario confirmar que el efecto antidepresivo no está enmascarado con un incremento en la conducta motora de los animales, por lo que se debe confirmar dicha actividad con pruebas de actividad motora espontánea (Petit-Demouliere *et al.* 2005), como el campo abierto.

7.1.4 Efecto de BtHA en la prueba de Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)

En la figura 15 se observa los resultados de la prueba de LEC en donde el grupo control negativo, que recibió sólo el VEH mostró un porcentaje de cruces a brazos abiertos (NA) del 23 %, mientras que el tiempo que permanecen en los mismos brazos (TA) fue del 19 %. Aquellos animales que recibieron la dosis de 1 mg/kg del ansiolítico DZP presentaron un incremento significativo respecto al VEH en ambos parámetros ($p < 0.05$), con un NA y TA de 73 %. Un efecto similar fue observado con la administración aguda de BtHA a partir de la dosis de 100 mg/kg

(NA= 53 % y TA= 57 %), 200 mg/kg (NA= 53 % y TA= 67 %) y con 500 mg/kg (NA= 51 % y TA= 66 %), esta actividad fue estadísticamente diferente al grupo tratado con VEH y no se observó una dependencia de la dosis.

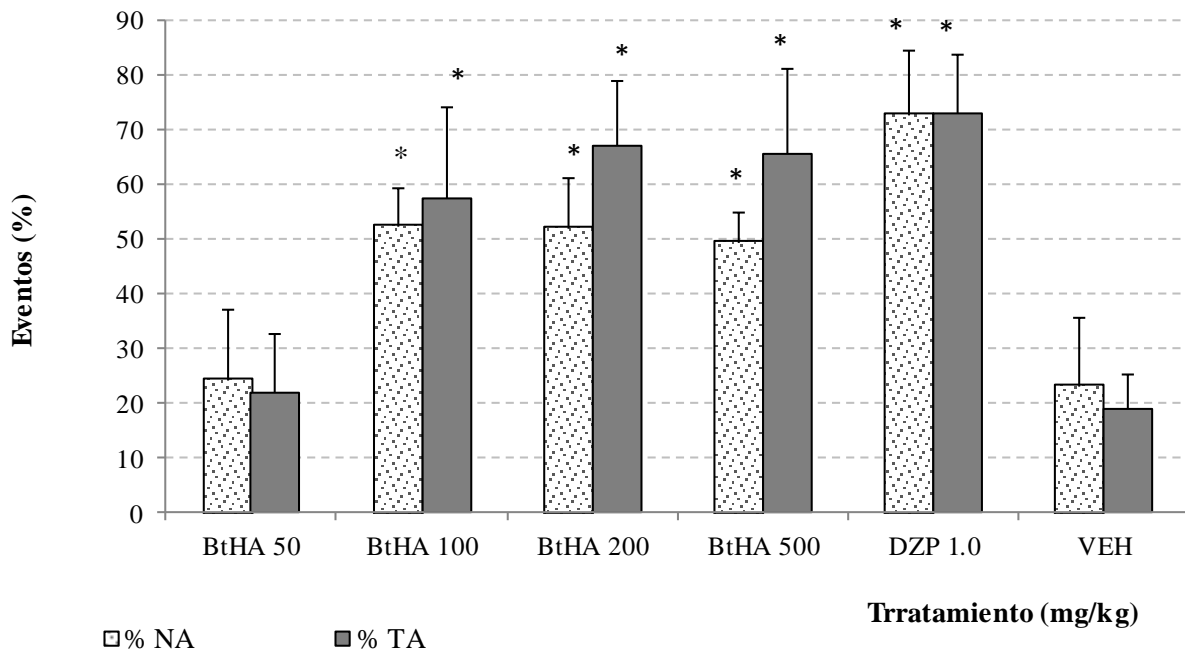


Figura 15.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA, sobre el porcentaje de cruces (%NA) y de Tiempo (%TA) que los ratones tienen en los brazos abiertos del LEC. DZP=diazepam; VEH= control negativo. Anova *post-prueba* de Dunnett se muestra promedio \pm DE (n=7).

Asociado al efecto que se le atribuye a *B. ternifolia* sobre el SNC, la evaluación de la actividad ansiolítica del BtHA en el modelo de LEC es para muchos autores una de las pruebas más empleadas para medir ansiedad y se fundamenta en la tendencia natural que los roedores tienen a explorar ambientes nuevos, además de evitar aquellos espacios brillantes, no protegidos y elevados (representados por los brazos abiertos del laberinto). Se ha demostrado que el colocar a los animales en estos lugares provoca un incremento en la defecación y en los niveles de corticosterona sérica, lo que hace de este modelo una importante prueba de

validación conductual y fisiológica. Y si además, se le suma que fármacos ansiolíticos como las benzodiacepinas, incrementan la exploración en los brazos abiertos, entonces se le puede atribuir al modelo una validación farmacológica (Pellow *et al.* 1986; File *et al.* 1990). El efecto ansiolítico de BtHA se observó desde la dosis de 100 y hasta 500 mg/kg, por un incremento significativo en los parámetros de % NA y % TA.

7.1.5 Efecto de BtHA en la prueba de campo abierto (CA)

Después de la administración de cualquiera de las diferentes dosis de BtHA, de DZP o VEH a los diferentes grupos de ratones, el comportamiento de éstos en el campo abierto no fue significativamente diferente entre los grupos ($p > 0.05$, figura 16).

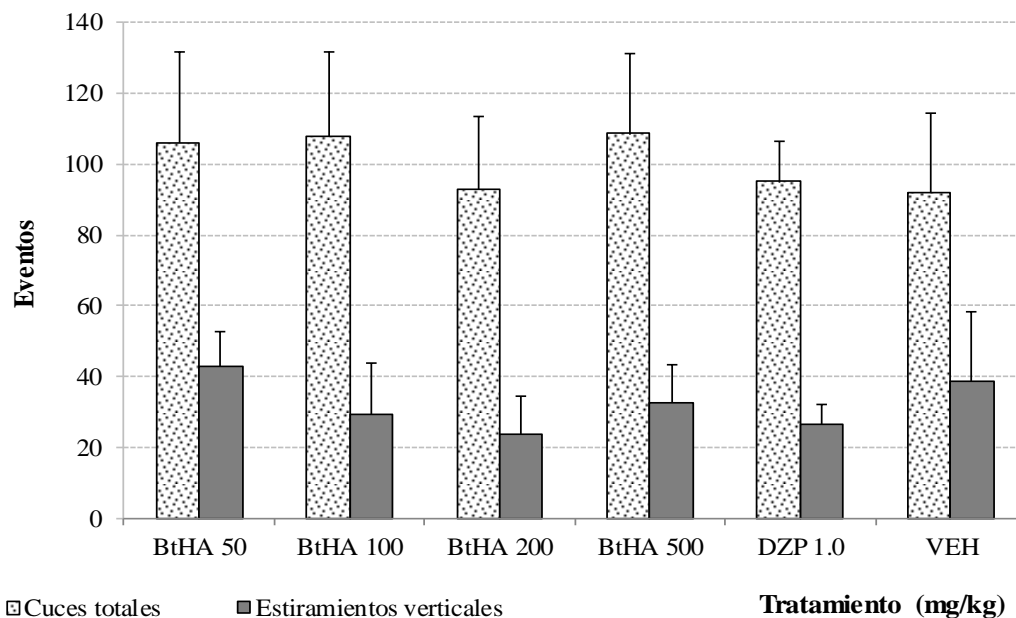


Figura 16.- Efecto de la administración de diferentes dosis de BtHA, sobre cruces totales y levantamientos verticales en CA. DZP= diazepam; VEH= control negativo. Anova *post*-prueba de Dunnet se muestra promedio \pm DE (n=7).

Se observó que ninguna de las dosis usadas modificó de manera significativa la actividad motora espontánea medida en campo abierto, en el cual se considera que un incremento en la locomoción de los ratones en respuesta a algún tratamiento, está relacionado con un efecto estimulante, mientras que un decremento en dicho parámetro se toma como un efecto sedante (Prut *et al.* 2003).

Por lo tanto los resultados observados en el modelo de LEC son reales y no el resultado de un efecto sedante o estimulante por parte de BtHA.

7.2 Primer fraccionamiento de BtHA

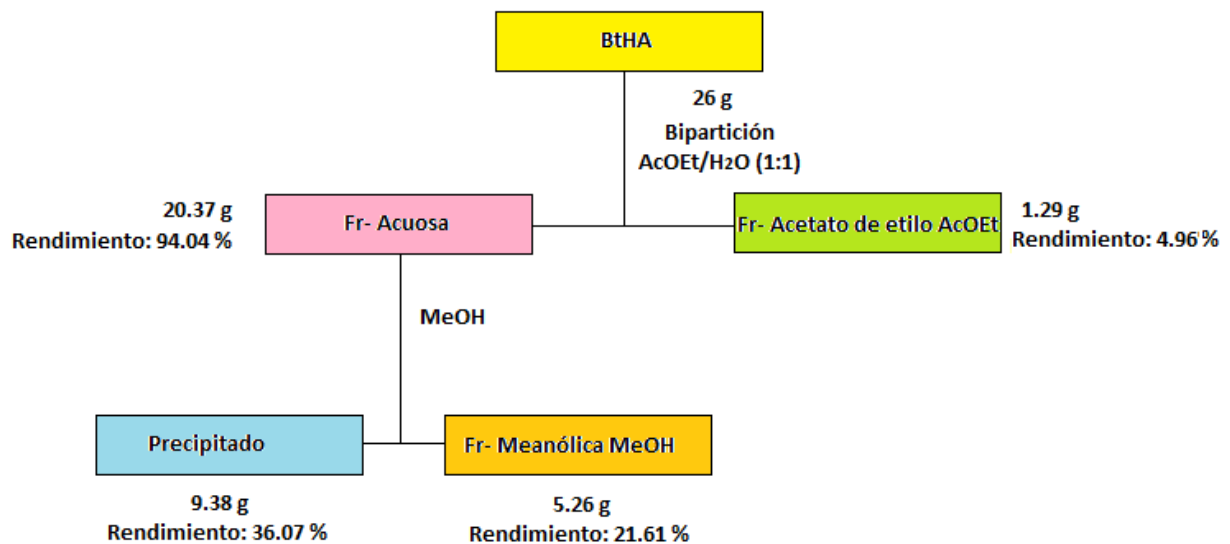


Figura 17.- Primer fraccionamiento de BtHA. Del cual se obtuvieron las fracciones Acetato de etilo (AcOEt), Precipitado (pp) y Metanólica (MeOH).

Del extracto BtHA se obtuvieron 118 g en peso seco que representa un rendimiento de 14.35 %, de este extracto se tomaron 26 g, con los que se realizó una

bipartición como se muestra en la figura 17, en esta misma figura se observan los rendimientos de cada una de las fracciones obtenidas. Estas fracciones fueron almacenadas para los diferentes ensayos biológicos y su análisis químico por cromatografía en capa fina y por HPLC.

7.2.1 Evaluación de la actividad enzimática

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa GraphPadPrism5, y se demostró que la actividad del extracto de cerebro se comporta según el modelo de Michaelis-Menten (anexo 1) y que se ajusta a una recta al hacer la transformación de Lineawer-Burk (anexo 2). Con estos datos se determinó que la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción fue de 6.515×10^{-4} mmol/min y el valor de K_m fue de 1.86 mM.

Después de estandarizar la concentración media de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción, se procedió a determinar la concentración inhibitoria al 50 % (IC_{50}) de BtHA, la cual se determinó en 0.04 mg/ml (anexo 3).

7.2.2 Inhibición enzimática

Para determinar el porcentaje (%) de inhibición sobre la AChE de BtHA y de las diferentes fracciones obtenidas del primer fraccionamiento, los ensayos de inhibición enzimática se realizaron con la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción (K_m) y con la concentración de extracto necesaria para inhibir al 50% la reacción enzimática (IC_{50}). El porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones se obtuvo por medio de la inclusión de los valores de V_{max} en la fórmula reportada por Muñoz y colaboradores en 2005 (Muñoz *et al.* 2005), los resultados obtenidos se muestran en la figura 18.

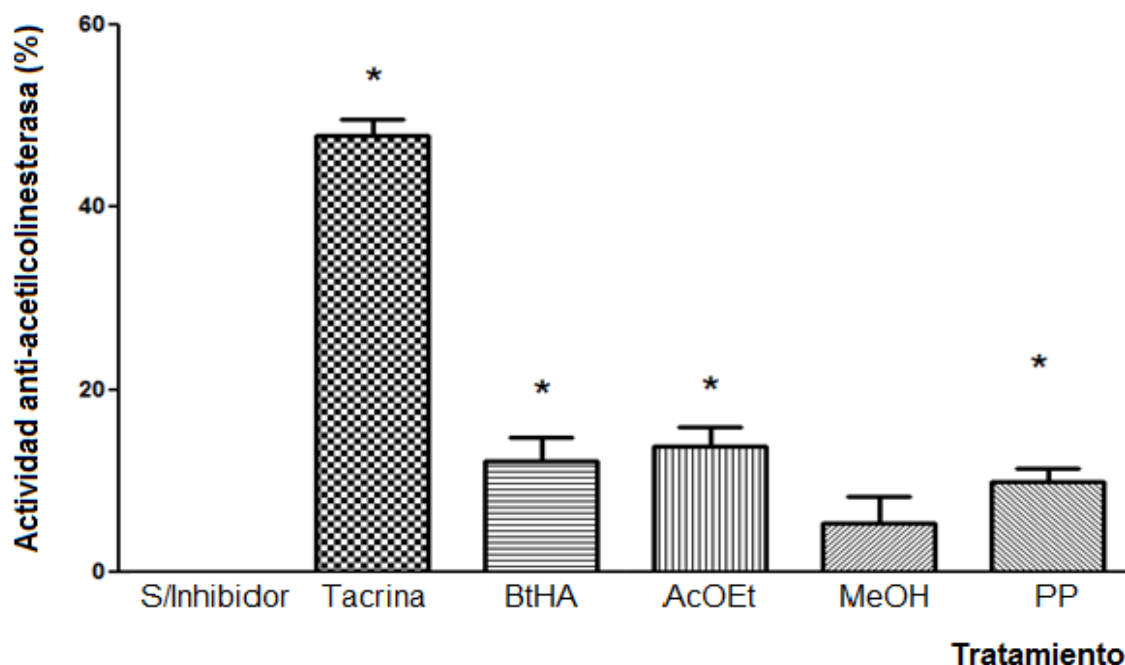


Figura 18.- Gráfica representativa de la actividad anti-acetilcolinesterasa, de las diferentes fracciones de BtHA obtenidas del primer fraccionamiento (* Diferencia significativa con respecto al control sin inhibidor).

En la figura anterior se observa que tanto BtHA como Fr-AcOEt y Fr-PP (precipitado) tienen un porcentaje de inhibición estadísticamente significativo con

respecto al control negativo que fue la reacción sin inhibidor, sin embargo fueron BtHA y Fr-AcOEt las que presentaron un mayor porcentaje de inhibición (12.26 % y 13.81 %), respectivamente. Estos porcentajes de inhibición son más bajos que el control positivo Tacrina, el cual presentó un efecto inhibitorio del 47.87 %.

Aunque los resultados obtenidos con las fracciones de BtHA no muestran un efecto muy potente, si se observa una tendencia de incremento en la actividad de Fr-AcOEt.

Sin embargo como se mencionó anteriormente en el apartado de estudios fitoquímicos de *B. ternifolia*, en Fr-AcOEt obtenida a partir de un extracto hidroalcohólico de esta misma especie se han detectado compuestos de tipo triterpenos, específicamente ácido ursólico, el cual ha sido objeto de diversos estudios y ha demostrado efecto contra la AChE (García-Morales, 2010; Herrera-Ruiz *et al.* 2012).

Por principio de cuentas, el ácido ursólico, es un triterpeno natural que está presente en una amplia variedad de plantas (Liu, 1995; Checker *et al.* 2012). Varios efectos bioquímicos y farmacológicos del ácido ursólico como son anti-inflamatorio, antioxidante, anti-cancerígeno, anti-mutagénico, anti-arteriosclerótico, anti-hipertensivo, anti-leucémico y propiedades antivirales han sido reportadas en varios sistemas experimentales (Ikeda *et al.* 2008; Tsai *et al.* 2008).

Así mismo, la búsqueda de inhibidores de la AChE, a partir de las plantas medicinales condujo al aislamiento de triterpenos como el ácido ursólico, a partir de un extracto de *Origanum mejorana* L. (Lamiaceae), el cual demostró tener el potencial para inhibir la actividad de la AChE de forma dosis dependiente, de manera competitiva y no competitiva (Chung *et al.* 2001).

De esta manera los resultados observados en el ensayo de inhibición enzimática, nos permite pensar que el ácido ursólico presente en la fracción AcOEt previamente observado y reportado (García-Morales, 2010; Herrera-Ruiz *et al.* 2012) podría ser el compuesto responsable de inhibir la actividad de la AChE.

7.2.3 Actividad anti-inflamatoria.

De acuerdo a los antecedentes obtenidos en el 2008 por García-Morales, con 320 mg/ml de extracto hidroalcohólico se observa un potente efecto antiinflamatorio. A partir de este dato, se evaluó la mencionada actividad biológica de BtHA y sus fracciones Fr-AcOEt, Fr-MeOH y Fr-PP, los controles empleados para este ensayo fueron 4 mg/ml de Dexametasona (control positivo) y 0.025 mg/ml de TPA (control negativo). El efecto de cada fracción sobre la inflamación por el TPA, fue reportado como porcentaje de actividad antiinflamatoria (Figura 19).

Los resultados obtenidos del ensayo de inflamación (figura 19) mostraron un importante efecto antiinflamatorio de BtHA (54.75 %) y un incremento de este efecto

en Fr-AcOEt (86.91 %) comparado con el efecto producido por la dexametasona (90.94 %). El análisis estadístico demostró diferencias estadísticamente significativas en BtHA y Fr-AcOEt con respecto al grupo de TPA.

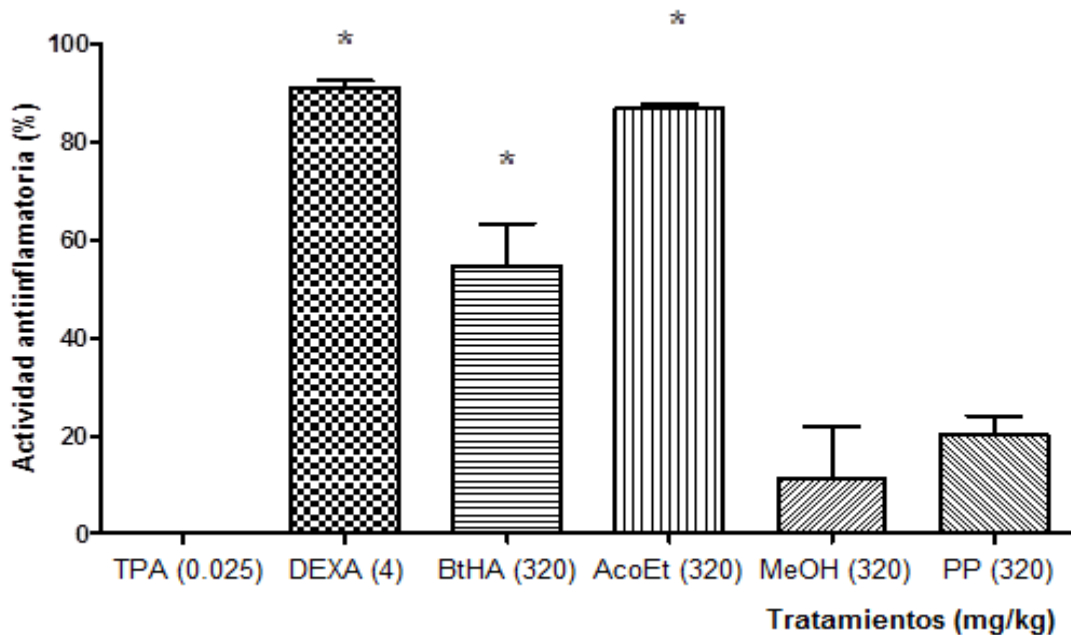


Figura 19.- Efecto antiinflamatorio de BtHA y sus fracciones obtenidas del primer fraccionamiento (* Diferencia significativa con respecto al control TPA, $p < 0.05$).

Además como se puede observar, es Fr-AcOEt la que muestra el mejor efecto, en este caso el efecto anti-inflamatorio y como se mencionó anteriormente es en esta fracción en donde se encuentra una mayor cantidad de ácido ursólico (García-Morales, 2010; Herrera-Ruiz *et al.* 2012).

Este triterpeno, durante mucho tiempo fue considerado biológicamente inactivo (Liu, 1995). Pero en años recientes ha atraído mucho la atención por sus

efectos farmacológicos combinados con una baja toxicidad (Novotny *et al.* 2001). En algunos reportes se menciona que el ácido ursólico muestra efectos anti-inflamatorios en células RAW264.7 (línea celular de monocitos de ratón), por atenuación de la expresión inducida de la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Suh *et al.* 1998; Ryu *et al.* 2000). Subbaramaiah indica que el tratamiento con ácido ursólico suprime la inducción COX-2 mediada por TPA y la síntesis de PGE2 de células mamarias humanas e inhibió la activación la proteína cinasa C (Subbaramaiah *et al.* 2000).

Así mismo el extracto metanólico de hojas de *Mallotus peltatus*, en el cual el ácido ursólico es el principal compuesto, exhibe actividad anti-inflamatoria significativa contra el edema inducido por carragenina en pata de rata, y fue potencialmente comparable al efecto antiinflamatorio de la indometacina (Chattopadhyay *et al.* 2002). Además el ácido ursólico aislado de *Nepeta sibthorpii* Bentham y *Verbena officinalis* también inhibe el edema en pata de rata inducido por carragenina (Miceli *et al.* 2005; Deepak *et al.* 2000). El ácido ursólico también ha demostrado inhibir el edema de oreja de ratón inducido por TPA y aceite de croton (Ismaili *et al.* 2001; Recio *et al.* 1995; Altinier *et al.* 2007; Baricevic *et al.* 2001; Park *et al.* 2004; Fan *et al.* 2004). Este efecto anti-inflamatorio del ácido ursólico, ha sido atribuido a la inhibición de diferentes eventos de reacciones inflamatorias, como la liberación de histamina, 5-lipooxigenasa y producción de NO y PGE2 (Liu, 1995; Ryu *et al.* 2000; Suh *et al.* 1998; Ringbom *et al.* 1998; Diaz *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, sugieren que el fraccionamiento de BtHA favoreció el efecto antiinflamatorio, sobre todo en Fr-AcOEt, por lo tanto el análisis de los compuestos presentes en esta fracción eran indispensables para adjudicar con precisión el efecto biológico al ácido ursólico.

7.2.4 Actividad antioxidante por el método de TBARS (Especies Reactivas de Ácido Tiobarbiturico)

La figura 20 muestra el efecto antioxidante de las fracciones del primer fraccionamiento en la cual se observa nuevamente que Fr-AcOEt tiene un excelente efecto antioxidante (78.19 %), muy similar al obtenido con el antioxidante control quercetina el cual mostro un efecto de 90 %.

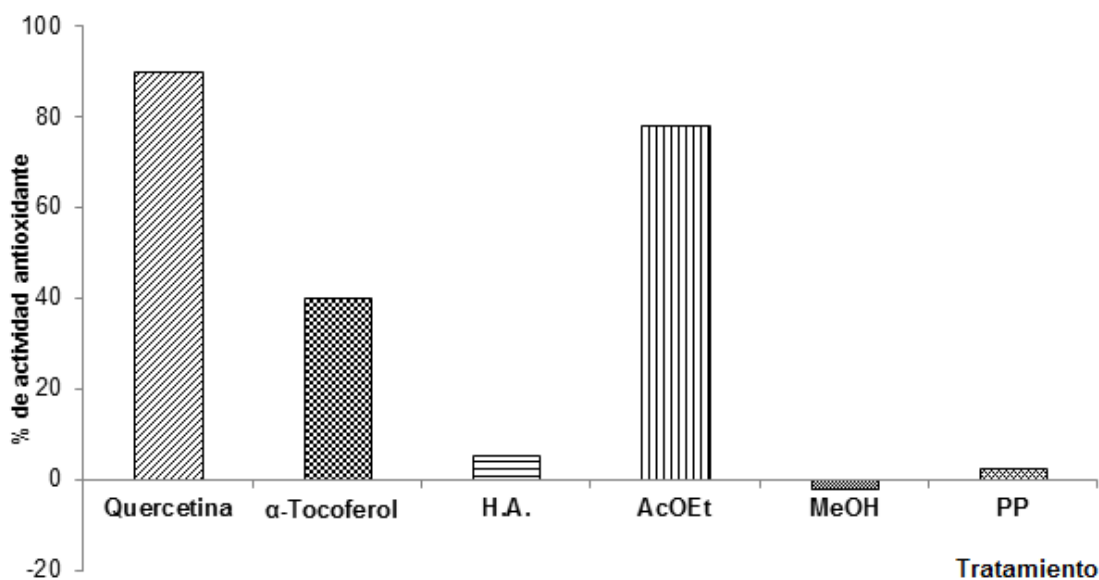


Figura 20.- Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones del primer fraccionamiento con respecto a los controles antioxidantes quercetina y α-Tocoferol.

Cabe mencionar que nuevamente Fr-AcOEt la que conserva la mayor actividad antioxidante y es en esta fracción en donde se ha reportado la presencia de compuestos como el ácido ursólico, del cual también se ha reportado que reduce el daño oxidante inducido por la acumulación de β A, como son la formación de radicales libres y peroxidación de lípidos, estos resultados se observaron en ensayos *in vitro* (Heo *et al.* 2002). Este triterpeno inhibe la unión de β A a la microglía, reduciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno neurotóxicas, conduciendo a un efecto neuroprotector contra β A (Wilkinson *et al.* 2011).

Así mismo, en otro experimento, la administración de ácido ursólico en ratas a una dosis de 20 mg/kg, controla el estrés oxidante inducido con etanol, en hígado y corazón, por un decremento de los productos de la peroxidación de lípidos (especies reactivas de ácido tiobarbiturico TBARS e hidroperóxidos de lípidos), incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidase etc. (Saravanan *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos tanto del efecto anti-acetilcolinesterasa como el efecto anti-inflamatorio y antioxidante, demuestran que el primer fraccionamiento logró incrementar el efecto protector de BtHA concentrándolo en una sola fracción (Fr-AcOEt). Esto permitió, de acuerdo a los objetivos planteados en el proyecto, realizar la caracterización química de aquella fracción que mostró el mejor efecto contra los tres parámetros mencionados.

Además se realizó el fraccionamiento de Fr-AcOEt, para poder elucidar, los posibles compuestos responsables de las tres actividades y evaluarlos por separado en los modelos de inhibición enzimática y anti-inflamatoria.

7.2.5 Análisis químico del primer fraccionamiento de BtHA

Con la finalidad de conocer los grupos químicos presentes en las diferentes fracciones obtenidas se realizó un análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de fase normal (FN). Con una fase móvil de Hex:AcOEt en proporción 7:3 y usando como agente revelador al sulfato sérico, se logró identificar al ácido ursólico y β -Sitosterol en BtHA y en Fr-AcOEt (figura 21). Lo cual concuerda con lo reportado por García-Morales en el 2010 y Herrera-Ruiz en el 2012.

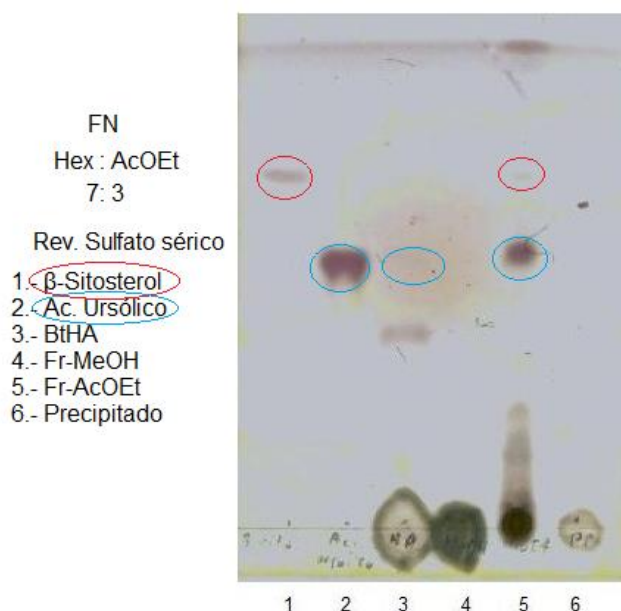


Figura 21.- Placa cromatográfica (CCF) en fase normal (FN) donde se observa la presencia del ácido ursólico y β -Sitosterol en BtHA y Fr- AcOEt.

Siguiendo la metodología descrita para el análisis por HPLC de las fracciones de BtHA, se inyectaron primeramente los controles, ácido ursólico y ácido oleanólico (anexo 4 y 5 respectivamente), para determinar su tiempo de retención y su longitud de onda y poder utilizar estos parámetros en su búsqueda dentro de las diferentes fracciones. El hecho de inyectar estos dos compuestos se debe a que en las plantas, por lo general estos dos compuestos se encuentran juntos y su diferencia estructural consiste solo en el cambio de posición de un metilo (CH_3) del carbono 20 al 19 (Ki-Yeol *et al.* 2012; Jacob *et al.* 2012) como se observa en la figura 22.

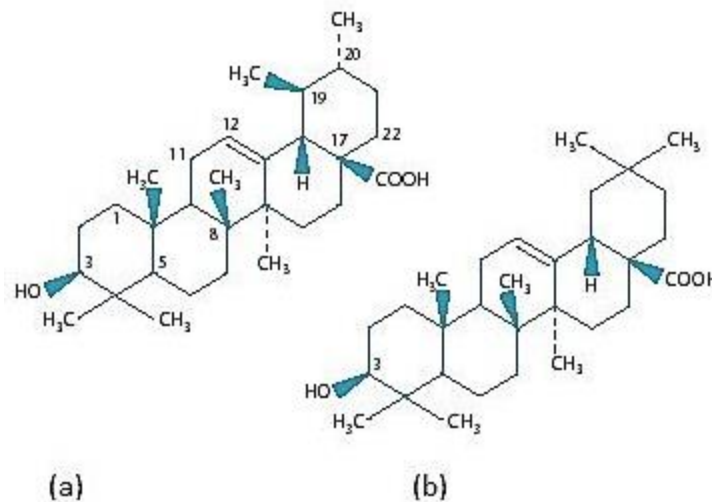


Figura 22.- Estructura química del ácido ursólico (a) y el ácido oleanólico (b).

En el anexo 4 se observa el cromatograma específico del ácido ursólico que muestra que su tiempo de retención es de 25.8 min y una longitud de onda de 193.5 nm. En el anexo 5 se observa el cromatograma específico del ácido oleanólico que muestra un tiempo de retención de 25.5 min y a una longitud de onda de 192.3 nm.

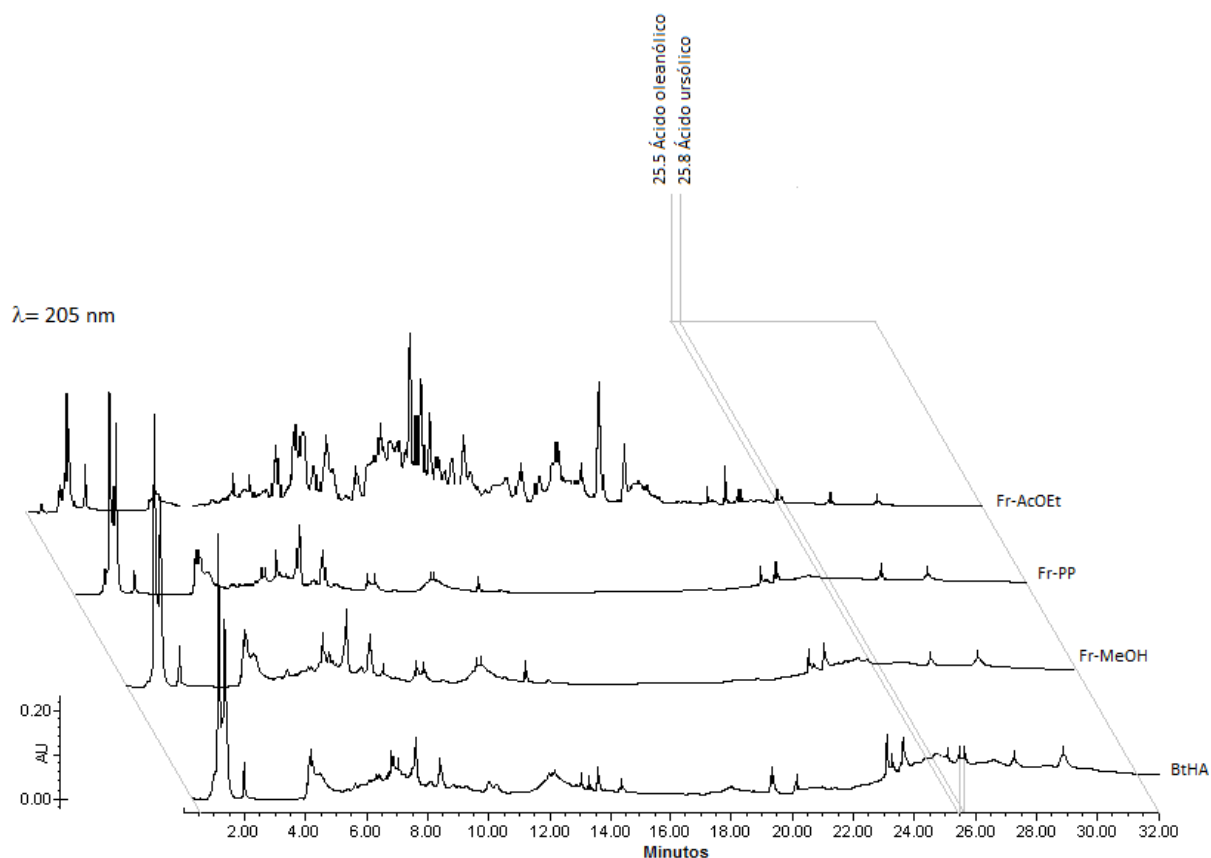


Figura 23.- Cromatograma de BtHA, Fr-MeOH, Fr-PP y Fr-AcOEt. En donde se observa la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico a una longitud de onda de 205 nm.

En la figura 23 se muestran los cromatogramas obtenidos de BtHA y las fracciones obtenidas con el primer método de fraccionamiento, en el cual se observan una gran cantidad de compuestos de diferente polaridad, dentro de estos, los picos encontrados en los primeros minutos de corrida (izquierda del cromatograma) y de acuerdo a la longitud de onda que mostraron, podrían formar parte del grupo de los flavonoides, y los compuestos ubicados casi en los últimos minutos de corrida (derecha del cromatograma) podrían pertenecer al grupo de los terpenos. Entre estas señales se observan unos pequeños picos que corresponden a los tiempos de retención y longitudes de onda de los ácidos ursólico y oleanólico previamente identificados.

Por medio de una extrapolación del área bajo la curva de ambos picos observados en la figura 23 a una curva de calibración de ácido ursólico y ácido oleanólico, se pudo cuantificar la cantidad por gramo de extracto de cada uno de estos compuestos en BtHA y sus fracciones (Tabla 2).

En la misma imagen (figura 23) se observa el cromatograma de la Fr-MeOH, donde se puede observar que se logró separar los compuestos más polares de los menos polares, dado que en el centro del cromatograma, no se observa ningún pico, sin embargo a pesar de esta clara separación, el solvente no arrastro los compuestos de ácido ursólico y ácido oleanólico, pero sí algunos compuestos de alta polaridad no identificados, que pueden pertenecer al mismo grupo (terpenos), lo que podría concordar con la baja actividad de inhibición enzimática de esta fracción. También se observa que el cromatograma de Fr-PP es idéntico al obtenido con Fr-MeOH y por lo tanto tampoco se observan los picos correspondientes al ácido ursólico y ácido oleanólico.

En esta misma figura también se muestra el cromatograma obtenido de Fr-AcOEt, que fue la fracción que mostró mayor actividad de inhibición enzimática, anti-inflamatoria y antioxidante. En este cromatograma se puede observar la elevada cantidad de compuestos que rodean a los picos de ácido ursólico y oleanólico, lo que permite ver que el fraccionamiento no favoreció de gran manera la separación de los compuestos, sin embargo al cuantificar la concentración de ambos compuestos

(ácido ursólico y ácido oleanólico), se obtuvieron 14.7 mg/g de extracto y 19.5 mg/g de extracto respectivamente (Tabla 2).

Basados en la información obtenida de estos cromatogramas podemos decir que el fraccionamiento, favoreció el acúmulo de los ácidos ursólico y oleanólico en una sola fracción, sin embargo aún estaban mezclados con muchos otros compuestos y su concentración no se incrementó por mucho, lo que no permitió determinar con seguridad que estos compuestos fueran los únicos responsables de la actividad anti-acetilcolinesterasa, por esta razón se propuso llevar a cabo el segundo fraccionamiento, para obtener fracciones menos complejas y que favorecieran el enriquecimiento de alguna fracción con los ácidos ursólico y oleanólico.

7.3 Segundo fraccionamiento de BtHA

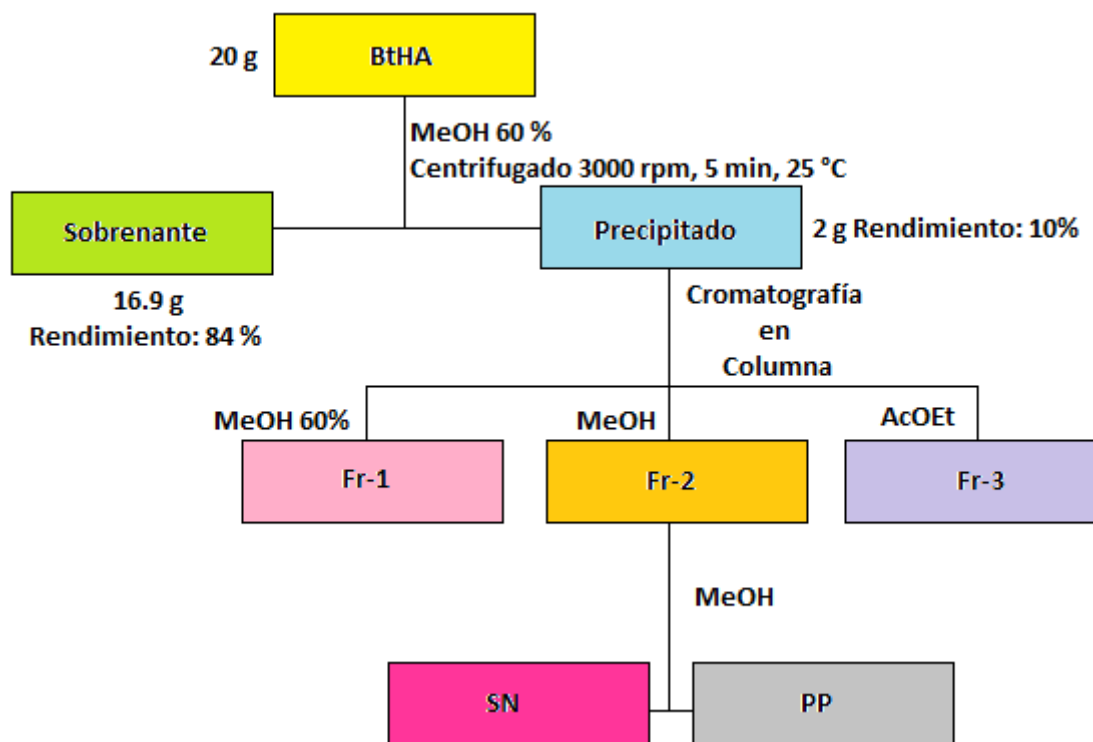


Figura 24.- Segundo fraccionamiento de BtHA, del cual se obtuvieron las siguientes fracciones Fr-1, Sobrenadante de la fracción 2 (SNFr-2), precipitado de la fracción 2 (PPFr-2) y fracción 3 (Fr-3).

En la figura 24 se observan los rendimientos de las fracciones obtenidas en el segundo fraccionamiento de BtHA, cabe destacar que en este fraccionamiento, solo el precipitado de BtHA fue separado por cromatografía en columna (CC).

Posteriormente las diferentes fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) para caracterizar los compuestos presentes en cada una de ellas. Además estas fracciones también fueron analizadas por HPLC, utilizando el mismo método que el primer fraccionamiento. Estas fracciones también fueron almacenadas para su uso en las diferentes pruebas biológicas

7.3.1 Inhibición enzimática del segundo fraccionamiento de BtHA

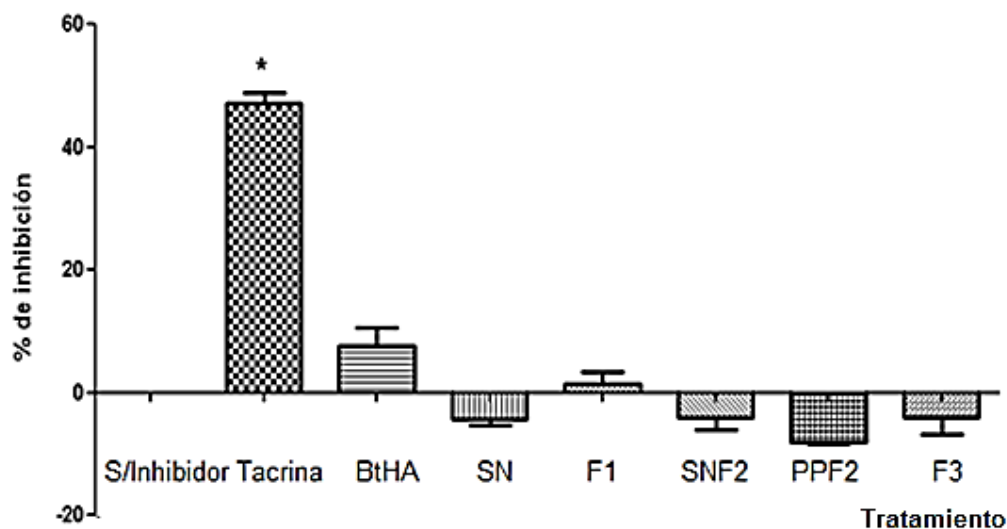


Figura 25.- Gráfica que representa el porcentaje de actividad inhibitoria de las fracciones del segundo fraccionamiento de H. A. ($p < 0.05$ * Diferencia significativa con respecto al control).

De la misma forma que se evaluaron las fracciones anteriores, también se evaluaron las fracciones obtenidas del segundo fraccionamiento y se determinó su porcentaje de inhibición enzimática. En la figura 25 claramente se observa que BtHA, conserva su actividad anti-AChE, sin embargo el resto de las fracciones presentan una pérdida de actividad por lo tanto este fraccionamiento no favoreció la centralización del efecto en una fracción, pero nos permitió establecer que los compuestos presentes en esas fracciones no son los responsables de la actividad anti-AChE observada con BtHA.

7.3.2 Actividad anti-inflamatoria del segundo fraccionamiento de BtHA

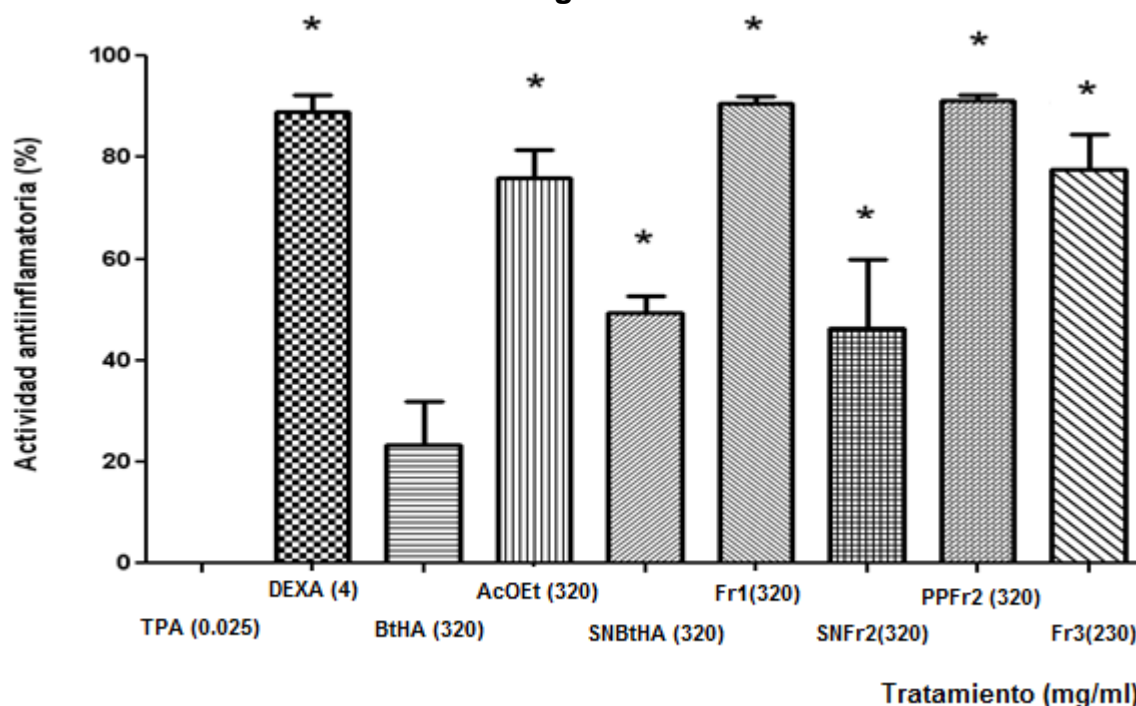


Figura 26.- Efecto antiinflamatorio de las diferentes fracciones del segundo fraccionamiento de BtHA, comparadas con el efecto de la fracción AcOEt del primer fraccionamiento (* Diferencia significativa con respecto al control TPA, $p < 0.05$).

En la figura 26 se observa el comportamiento de las fracciones obtenidas del segundo fraccionamiento en el modelo de inflamación inducida por TPA. En esta gráfica cabe destacar el incremento en la actividad anti-inflamatoria de las fracciones Fr-1 (90.69 %), PPFr-2 (91.19 %) y Fr-3 (77.6 %). Esta última tiene un efecto muy similar al obtenido con Fr-AcOEt del primer fraccionamiento, sin embargo las otras dos fracciones superan el efecto de Fr-AcOEt, alcanzando un efecto similar la dexametasona. Estos resultados demuestran que el segundo fraccionamiento favoreció el enriquecimiento de compuestos con actividad anti-inflamatoria en Fr-1 y PPFr-2, las cuales fueron posteriormente analizadas químicamente para determinar su composición química y adjudicar el efecto biológico a algún grupo de compuestos.

7.3.3 Actividad antioxidante por el método de TBARS del segundo

fraccionamiento de BtHA

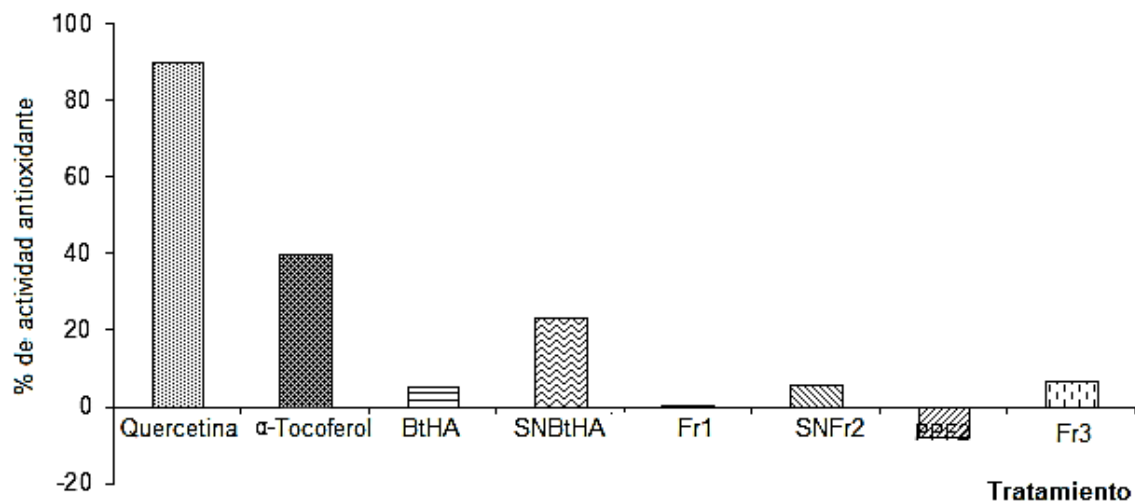


Figura 27.- Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones del segundo fraccionamiento con respecto a los controles antioxidantes quercetina y α -Tocoferol.

La figura 27 muestra que el efecto antioxidante del segundo fraccionamiento de BtHA prácticamente desaparece. Estos resultados indican que solo en Fr-AcOEt existen los compuestos necesarios para mantener un efecto antioxidante.

7.3.4 Análisis químico del segundo fraccionamiento de BtHA

Los resultados que se obtuvieron del análisis por cromatografía en capa fina del segundo fraccionamiento fueron los siguientes:

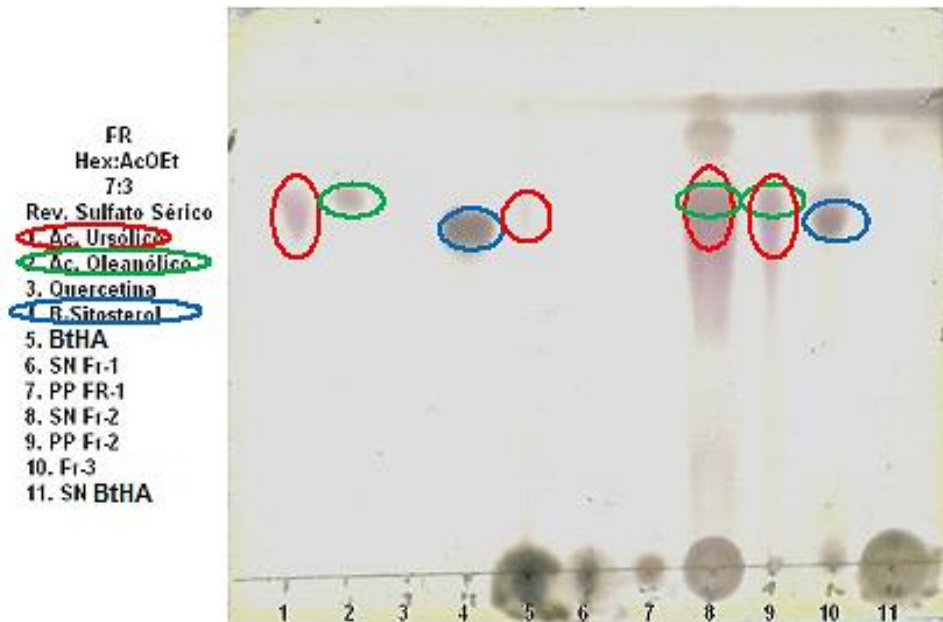


Figura 28.- Placa cromatográfica (CCF) en fase reversa (FR) de las diferentes fracciones del segundo fraccionamiento.

En la figura 28 se observa que los controles de ácido ursólico y oleanólico están presentes en muy baja concentración en BtHA, y en una alta concentración en SN Fr-2 y PP Fr-2, sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos del primer fraccionamiento, el ácido ursólico y oleanólico tienen una polaridad muy similar, por lo que este tipo de análisis, no permitió discernir cuál de los dos compuestos está en mayor concentración, o cual de los dos está o no presente, ya que en la placa cromatográfica se desplazan a la misma distancia el punto de aplicación, en contraste en Fr-1 y SN BtHA, éstos compuestos son imperceptibles. Además se

puede observar la presencia de β -sitosterol en la Fr-3. El cual también es un compuesto que se encuentra regularmente en las plantas y que podría tener un efecto biológico.

El análisis por HPLC de las fracciones obtenidas del segundo fraccionamiento se describe a continuación.

Como se mencionó anteriormente en la figura 23, BtHA presenta una gran cantidad de compuestos de diferente polaridad, dentro de los cuales, los picos encontrados a la izquierda del cromatograma y de acuerdo a la longitud de onda que mostraron, podrían formar parte del grupo de los flavonoides, y los compuestos ubicados a la derecha del cromatograma podrían pertenecer al grupo de los terpenos y entre ellos se observan unos pequeños picos que corresponden a los tiempos de retención y longitudes de onda de los ácidos ursólico y oleanólico previamente calculados. Como se dijo, en esta muestra se determinó que de ácido ursólico habían 11.1 mg/g de extracto y de ácido oleanólico 9.09 mg/g de extracto (Tabla 2).

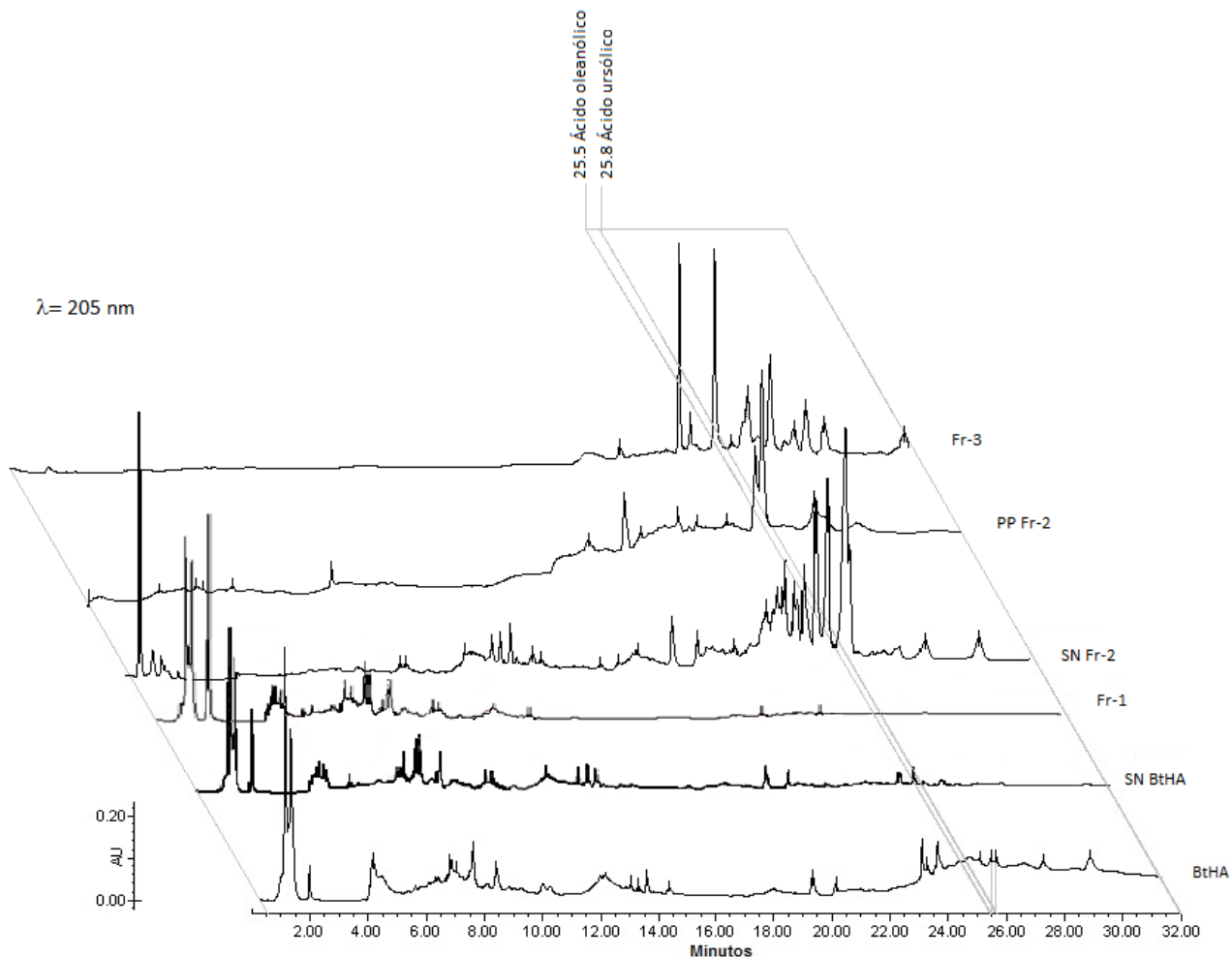


Figura 29.- Cromatograma del sobrenadante de BtHA en donde se observa la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico.

En la figura 29 se observa una mayor separación entre los compuestos más polares a la izquierda del cromatograma y los menos polares a la derecha del mismo y no se observa una aglomeración de compuestos como en la Fr-AcOEt del primer fraccionamiento. En esta figura también se puede observar la presencia de los ácidos ursólico y oleanólico en SNBtHA; la cuantificación de ambos compuestos fue la siguiente: ácido ursólico 0.6 mg/g de extracto y ácido oleanólico 5.6 mg/g de extracto.

El cromatograma de Fr-1 en la figura 29, muestra claramente una separación de los compuestos polares de los no polares. Comparándolo con el cromatograma de BtHA, se podrá notar que esta fracción logró retener muchos de los compuestos polares de BtHA y casi ninguno de los compuestos poco polares y ninguno de los ácidos ursólico y oleanólico.

El cromatograma de SNFr-2 muestra un conjunto de compuestos en el extremo derecho, que correspondería a los compuestos de menor polaridad del sistema y otros compuestos conjuntados en el centro del cromatograma que serían de una polaridad intermedia si se compara con BtHA; lo que deja ver que este fraccionamiento hasta este momento estaba logrando su cometido de separar mejor los compuestos de BtHA, cabe destacar que en esta fracción si se pudieron observar los picos característicos de los ácidos ursólico y oleanólico y se lograron cuantificar en 22.9 mg/g de extracto y 140.4 mg/g de extracto respectivamente (tabla 2), que al ser comparados con Fr-AcOEt del primer fraccionamiento (14.7 mg/g de extracto y 19.5 mg/g de extracto respectivamente) se observa un incremento en la concentración del ácido ursólico de casi el doble y hasta de siete veces más del ácido oleanólico.

El cromatograma de PPFr-2 muestra que la separación de los compuestos menos polares se ve favorecida con este método, dejando solo unos cuantos compuestos en el extremo más polar del cromatograma y casi nada de compuestos

de mediana polaridad. En esta fracción también se observan los picos característicos de los ácidos ursólico y oleanólico, que al hacer la cuantificación, se observa una inversión de las concentraciones de estos compuestos, siendo 54.6 mg/g de extracto y 20.8 mg/g de extracto respectivamente. Comparando estas concentraciones con las obtenidas en Fr-AcOEt del primer fraccionamiento (14.7 mg/g de extracto y 19.5 mg/g de extracto respectivamente) podemos observar que la concentración de ácido ursólico se encuentra ampliamente favorecida.

En el cromatograma de Fr-3 se observa que los compuestos polares desaparecen completamente del cromatograma y solo se conservan los menos polares, en esta fracción también se observan los picos correspondientes al ácido ursólico y al ácido oleanólico y su concentración fue la siguiente 34.6 mg/g de extracto del ácido ursólico y 7.6 mg/g de extracto del ácido oleanólico. Aunque la concentración de ambos compuestos disminuyó en esta fracción, en proporción el ácido ursólico todavía es mayor que su proporción en la fracción de AcOEt del primer fraccionamiento.

Al comparar los resultados de la concentración del ácido ursólico y ácido oleanólico de ambos fraccionamientos (tabla 2) podemos observar que el primer fraccionamiento favorece la acumulación de estos compuestos en una sola fracción que fue Fr-AcOEt, sin embargo su concentración, es casi la misma que en BtHA. Por otra parte el segundo fraccionamiento logra separar mucho mejor los compuestos menos polares de los más polares, y además permite enriquecer con ácido

oleanólico a SNFr-2 y con ácido ursólico a PPFr-2 y Fr-3 incrementando la concentración de ambos compuestos comparados con el fraccionamiento 1 de BtHA.

Tabla 2.- Cuantificación de ácido ursólico y oleanólico presente en los fraccionamientos 1 y 2 de BtHA.

Fraccionamiento 1	Ácido ursólico mg/g de exto.	Ácido oleanólico mg/g de exto.
BtHA	11.1	9.09
Fr-AcOEt	14.7	19.5
Fr-MeOH	N/D	N/D
Fr-PP	N/D	N/D
Fraccionamiento 2		
SN BtHA	0.6	5.6
FR1	N/D	N/D
SNFR2	22.9	140.4
PPFR2	54.6	20.8
FR3	34.6	7.6

ND=No detectable

El análisis químico de este segundo fraccionamiento nos permitió deducir que ni el ácido ursólico ni el oleanólico eran los compuestos responsables de la actividad anti-AChE, pero cabe la posibilidad de que sea necesaria la presencia de ambos compuestos en una sola fracción para obtener un efecto biológico.

Sin embargo en el ensayo de inflamación inducida por TPA en el pabellón auricular de ratón, como se observa en los resultado obtenidos, la fracción con mayor porcentaje de actividad anti-inflamatoria, es la que contiene una mayor concentración de ácido oleanólico (SNFR2), el cual ha sido reportado con varios efectos biológicos como anti-diabético, anti-oxidante, anti-inflamatorio y hepatoprotector (Ki-Yeol *et al.*

2012; Cho *et al.* 2009_a; Cho *et al.* 2009_b; Wang *et al.* 2010), pero además de esto la fracción con mayor concentración de ácido ursólico (PPFR-2) también potenció considerablemente su efecto anti-inflamatorio, si se compara con el porcentaje de actividad anti-inflamatoria de Fr-AcOEt del primer fraccionamiento.

Los resultados obtenidos con el segundo fraccionamiento confirman la idea de que el ácido ursólico en conjunto con el ácido oleanólico son los principales compuestos responsables de la actividad anti-inflamatoria pero no de la actividad anti-AChE ni anti-oxidante.

7.4 Fraccionamiento de Fr-AcOEt

Como Fr-AcOEt del primer fraccionamiento, fue la fracción que mantuvo tres propiedades farmacológicas (anti-AChE, anti-inflamatoria y antioxidante), se propuso elucidar más fondo la composición química de dicha fracción y determinar cuáles son los compuestos responsables de cada una de las actividades evaluadas.

Para determinar la composición química de Fr-AcOEt, se realizó el fraccionamiento que se describe en la figura 30.

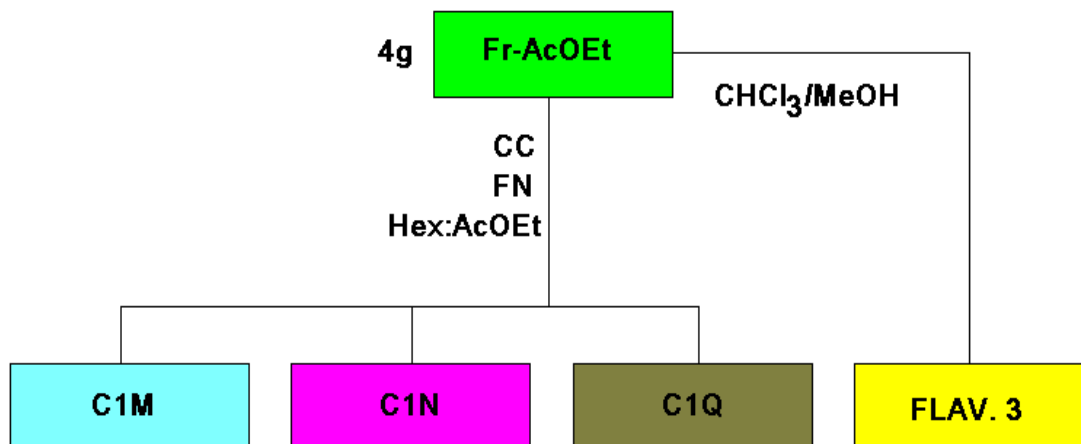


Figura 30.- Fraccionamiento de Fr-AcOEt de donde se obtuvieron fracciones con mayor polaridad que el ácido ursólico (C1M, C1N, C1Q), y una fracción rica en flavonoides (Flav. 3).

7.4.1 Actividad anti-acetilcolinesterasa y anti-inflamatoria de las fracciones obtenidas de la fracción AcOEt

Estas fracciones fueron evaluadas en los modelos de actividad de la enzima acetilcolinesterasa y anti-inflamatoria, su composición química se determinó a través de CCF y HPLC, cabe mencionar que de Fr-AcOEt, también se obtuvo una fracción rica en flavonoides, la cual también fue probada en los mismos modelos biológicos antes mencionados, así mismo se exploró su composición química.

En la figura 31 se observa la inhibición enzimática en porcentaje, de las fracciones obtenidas de Fr-AcOEt, en la capacidad de inhibición de la acetilcolinesterasa destaca la fracción C1Q, la cual muestra un porcentaje de inhibición de 43.34 %, siendo este un porcentaje mayor que el del control tacrina (42.88 %); seguido de la fracción de flavonoides 3 con un porcentaje de inhibición de 39.27 %. Además se corroboró la capacidad inhibitoria de BtHA (21.85 %) y de

Fr-AcOEt (13.89 %). Estos resultados nos muestran, que el fraccionamiento de Fr-AcOEt, favoreció la separación de compuestos que potencian el efecto de inhibición enzimática en las fracciones C1Q y flavonoides 3.

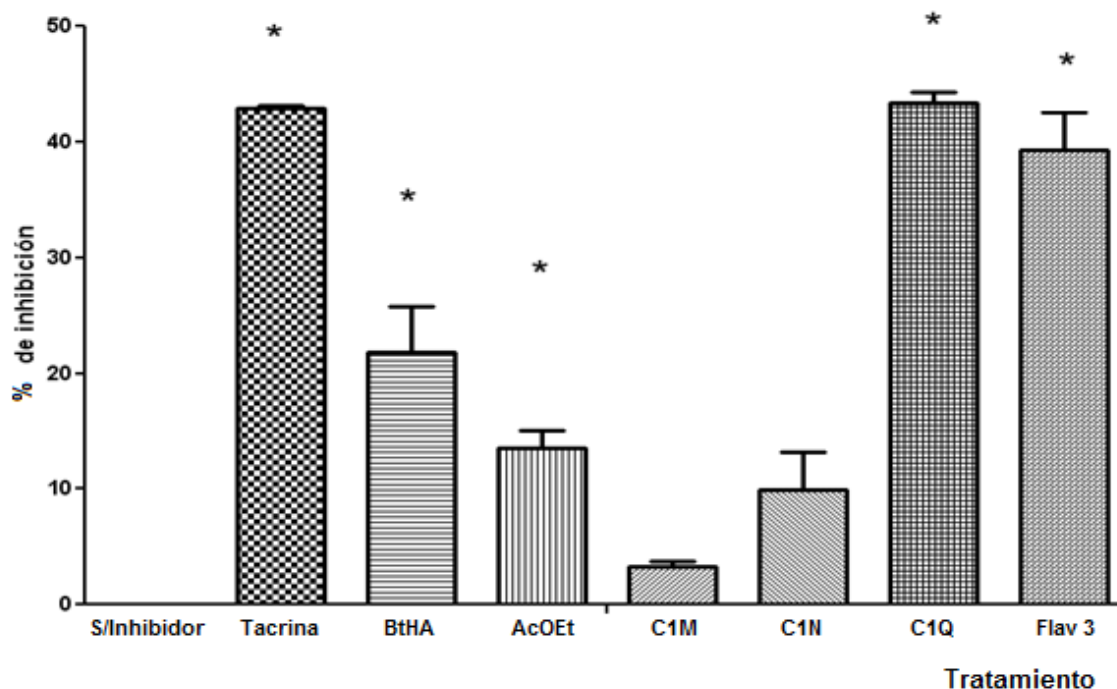


Figura 31.- Porcentaje de inhibición enzimática de las fracciones obtenidas del sub-fraccionamiento de AcOEt y la fracción rica en flavonoides (* diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sin inhibidor $p < 0.05$).

En la figura 31 se muestra en porcentaje la actividad antiinflamatoria de las fracciones mencionadas anteriormente. Todos los tratamientos mostraron diferencia significativa con respecto al control dexametasona (DEXA), sin embargo la mayor capacidad antiinflamatoria la mostraron las fracciones C1N con 91.3 %, porcentaje que incluso fue mayor que el control dexametasona (89.04 %). Esta actividad fue seguida por la fracción C1M con 80.84 % (ligeramente menor a la del control),

Fr-AcOEt con 75.9 % y flav 3 con 63.71 %. Estas actividades nos hace pensar que se logró separar en las fracciones C1N y C1M los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria reportada para BtHA y que la fracción de flavonoides 3 tiene compuestos que pueden ser responsables de gran parte de la actividad de inhibición enzimática (mencionada en la figura 31) y actividad antiinflamatoria mostrada en la gráfica 32.

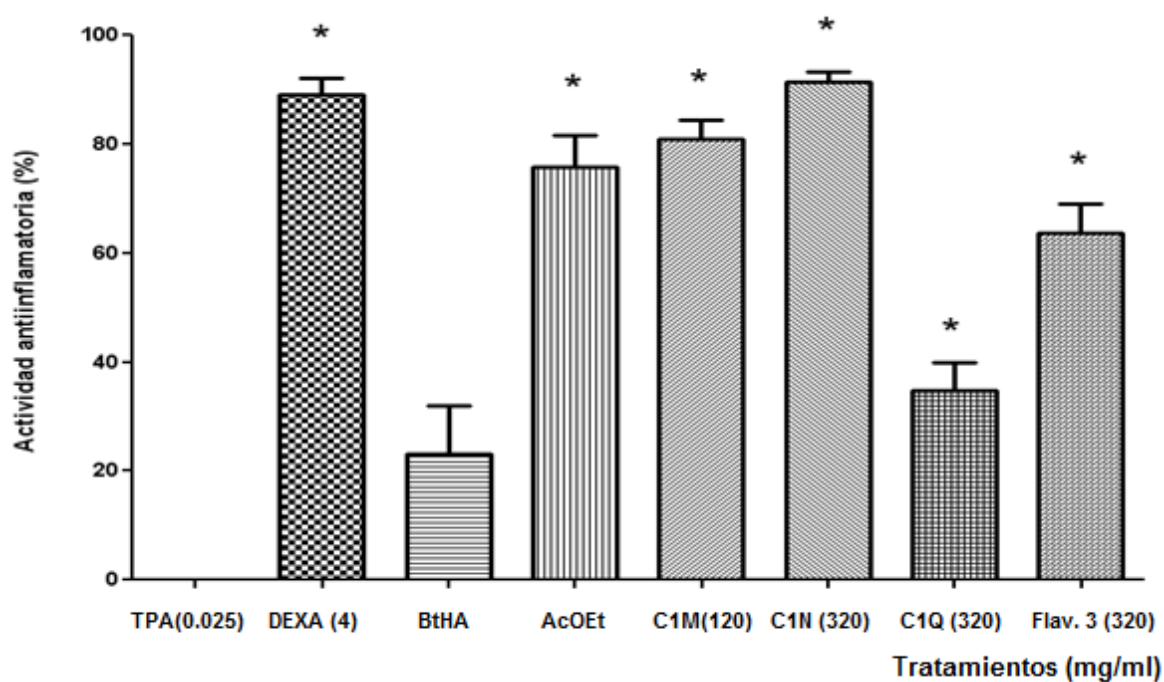


Figura 32.- Porcentaje de actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de Fr-AcOEt.

7.4.2 Análisis químico de las fracciones de Fr-AcOEt

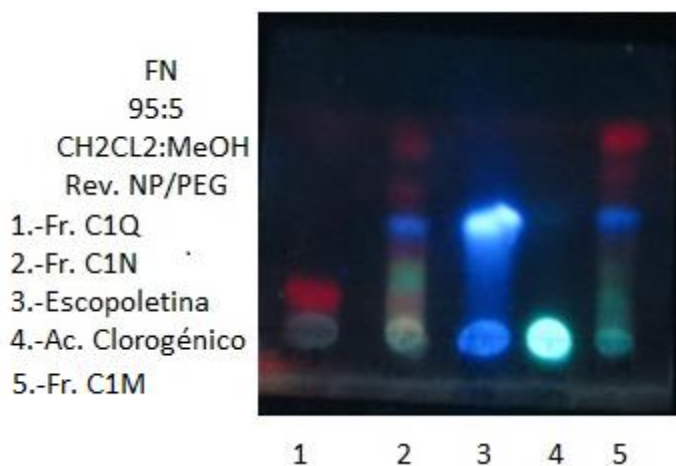


Figura 33.- Placa cromatográfica (CCF) en fase normal (FN) de las fracciones obtenidas de Fr-AcOEt.

En la figura 33, se observa la presencia de la cumarina escopoletina en la fracción C1M y C1N, aparentemente en una buena concentración, y en la fracción C1Q una muy baja concentración de ácido ursólico. La escopoletina es la principal cumarina activa aislada del tallo de *Erycibe obtusifolia* Benth, el cual es utilizado comúnmente como terapia para la artritis reumatoide en la medicina tradicional china, también se ha reportado por poseer actividades hipotensivas, vasorelajantes, antioxidantes y antihipeglucemicas, eventos relacionados con el síndrome metabólico (Panda *et al.* 2006; Kang *et al.* 1998; Xiujuan *et al.* 2012). La escopoletina también ha mostrado una fuerte propiedad anti-inflamatoria por reducir el edema auricular inducido por TPA y el dolor visceral producido por el ácido acético (Muschiatti *et al.* 2001; Meotti *et al.* 2006; Tien-Ning *et al.* 2012), además inhibe la producción de mediadores inflamatorios en macrófagos activados por lipopolisacáridos en una línea celular de mastocitos humanos (Kim *et al.* 2004; Moon *et al.* 2007).

Para corroborar que el compuesto observado en la placa cromatográfica era escopoletina, las fracciones C1M y C1N fueron analizadas y cuantificadas por HPLC con el mismo sistema empleado para elucidar los compuestos de la fracción de flavonoides.

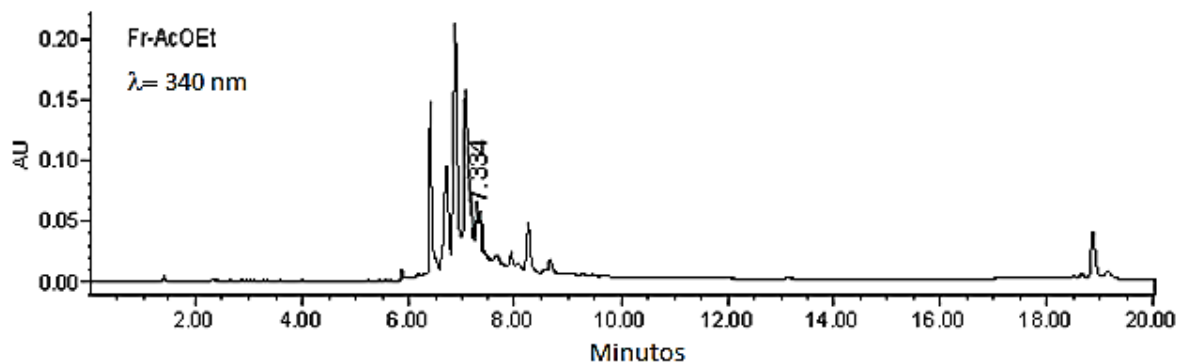


Figura 34.- Cromatograma de Fr-AcOEt en donde se observa la presencia de escopoletina.

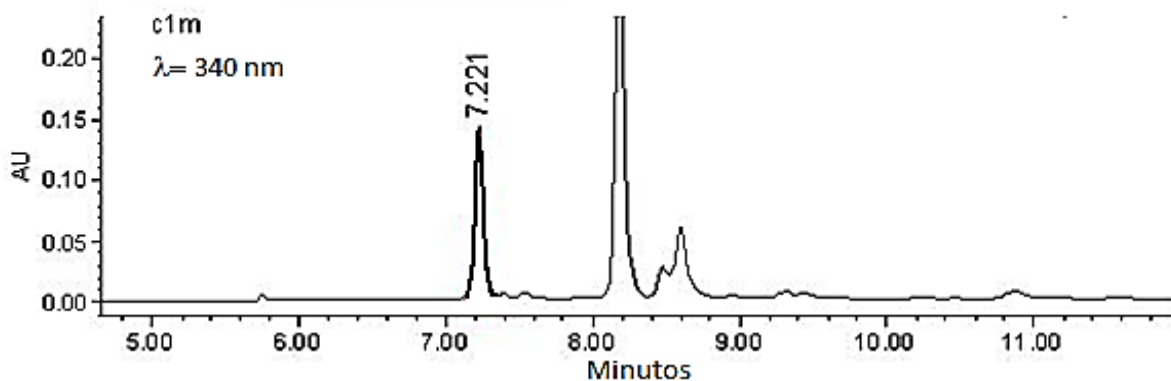


Figura 35.- Cromatograma de la fracción C1M en donde se observa la presencia de escopoletina.

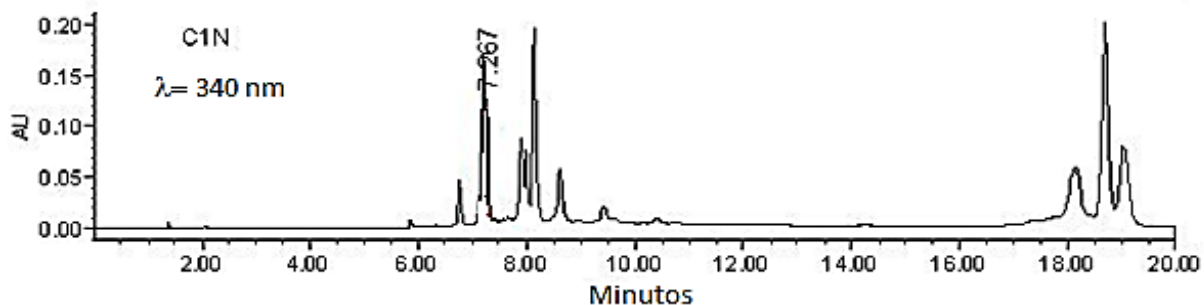


Figura 36.- Cromatograma de la fracción C1N que muestra la presencia de escopoletina.

En la figura 34, 35 y 36 se observa el pico característico de la escopoletina, el cual tiene un tiempo de retención de 7.3 o 7.2 min y su cuantificación se describe en la tabla 3.

Tabla 3.- Cuantificación de escopoletina presente en las fracciones de Fr-AcOEt.

Fracción	Escopoletina mg/g de exto
Fr-AcOEt	1.38
Fr-C1M	5.85
Fr-C1N	1.68

7.5 Sub-fraccionamiento de la fracción rica en flavonoides (Flav3)

Debido a que la fracción de Flav. 3 mantuvo un buen efecto anti-acetilcolinesterasa y un buen efecto anti-inflamatorio se propuso el fraccionamiento de esta fracción (Figura 37) para conocer su composición química. Este fraccionamiento se llevó a cabo utilizando sílica gel de fase reversa como fase estacionaria y una fase móvil de H₂O: acetonitrilo. De éste fraccionamiento se obtuvieron tres fracciones, denominadas C5C, C5J y C5M.

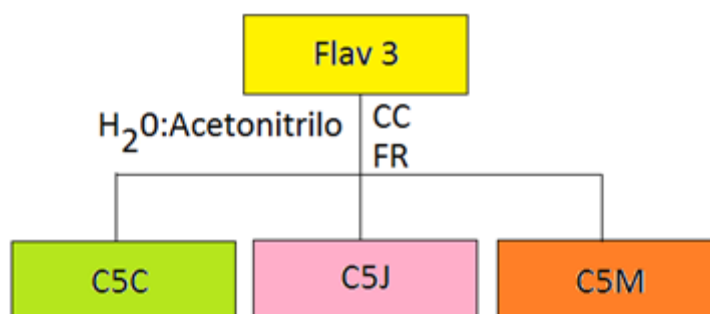


Figura 37. Esquema del fraccionamiento de Flav 3.

7.5.1 Análisis químico de las sub-fracciones de Flav3

Estas fracciones fueron analizadas por HPLC y por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

Este análisis demostró la presencia de los siguientes flavonoides: rutina, ácido clorogénico, glucósido de quercetina y ramnósido de quercetina. Su cuantificación se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.- Cuantificación de los Flavonoides en *Bouvardia ternifolia*

Compuesto ($\lambda = 350 \text{ nm}$)	BtHA ($\mu\text{g/ g exto}$)	Fr. AcOEt ($\mu\text{g/ g exto}$)	Flav-3 ($\mu\text{g/ g exto}$)
Rutina	229.9	13.5	10.7
*Ácido clorogénico	9.5	11.1	6.0
Glucósido de quercetina	415	889	614
Ramnósido de quercetina	12.8	23.7	8.4

*($\lambda = 326 \text{ nm}$)

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que aparecen por doquier en los alimentos de origen vegetal. Se han descrito más de 4000 flavonoides diferentes y se categorizan en flavonoles, flavonas, catequinas flavanonas, antocianidinas e isoflavonas (Hollman *et al.* 1997). Los flavonoides tienen una gran variedad de efectos biológicos tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* y se ha demostrado que ejercen actividades como antimicrobianas, antivirales, anti-ulcerogénicas, anti-

inflamatorias, antioxidantes, antihepatotóxicas y antihipertensivas (Formica *et al.* 1995).

Algunos flavonoides como la quercetina que es uno de los flavonoides más comunes en algunos vegetales y vinos tintos (Bhatia *et al.* 2001; Pekal *et al.* 2011) parece mostrar la más alta actividad antioxidante comparada con otros flavonoides (Valério *et al.* 2009). Previene la peroxidación de lípidos e inhibe la inflamación (Wagner *et al.* 2010). Es efectiva en la protección de la piel contra agentes como la radiación, el ozono y algunas toxinas, así como en la protección contra los rayos ultravioleta (UV) y contra el envejecimiento (dal Belo *et al.* 2009).

La Rutina también ha sido reportada como uno de los principales flavonoides en un gran número de plantas (Kim *et al.* 2005_a). Es empleada en alimentos para animales, cosméticos e industrias químicas como un pigmento natural, conservador de alimentos y absorbente de UV (Pu *et al.* 2005). Tiene varias propiedades farmacológicas, como antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-alérgicas, antivirales, anticarcinogénico y como potente eliminador de radicales superóxido (Kamalakkannan and Prinnce, 2006; Bishnoi *et al.* 2007).

Se ha reportado que la suplementación de rutina a partir de fuentes de alimentos naturales, como fideos de soba o grañones, podría mejorar el deterioro de

la memoria y disminuir la muerte neuronal en el hipocampo como sucede en la EA. La rutina tiene la capacidad de inhibir la activación microglial y las citocinas proinflamatorias (Koda *et al.* 2009).

El ácido clorogénico es otro de los principales compuestos polifenólicos presente en varios productos de la agricultura como el café, frijoles, papas y manzanas (Feng *et al.* 2005), está formado por la esterificación del ácido caféico y el ácido quínico (Dos Santos *et al.* 2006). Este compuesto tiene efectos cardioprotectores, actividad inhibitoria de la hiper-oxidación de lípidos y actividad antitumoral, además de actividad antioxidante asociada con la eliminación de radicales libres (Almeida *et al.* 2009; Bernatoniene *et al.* 2008; Mass *et al.* 2009; McIntyre *et al.* 2009; Namba and Matsuse, 2002). El ácido clorogénico actúa en el SNC atravesando la barrera hematoencefálica de forma intacta o como metabolito (Ito *et al.* 2008). También posee efectos neuroprotectores en la muerte celular inducida por peróxido de hidrogeno y A β en células PC12 y SH-SY5Y (Kim *et al.* 2005_b; Nakijama *et al.* 2007; Silva *et al.* 2004).

Con base en estos antecedentes es posible pensar que los efectos observados de la actividad anti-inflamatoria no recae solo en el ácido ursólico, sino en el conjunto de este compuesto con la rutina y la quercetina presentes en Fr- AcOEt, potenciando así el efecto de esta fracción, mejorándolo cuando se encuentran por separado. Así mismo la fracción Flav 3 rica en ácido clorogénico fue

la única fracción derivada del fraccionamiento de Fr-AcOEt, que favoreció el efecto contra la AChE, aunque no de forma potente, pero como se encuentra dentro de Fr-AcOEt, esto explicaría el efecto de esta fracción contra la AChE, y como es que este efecto se pierde cuando el ácido ursólico y oleanólico son separados del ácido clorogénico.

De esta manera el ácido clorogénico se perfila como el principal compuesto activo contra la AChE. Por otra, parte el hecho de que Fr-AcOEt posea entre sus componentes químicos, compuestos con propiedades antioxidantes como son los flavonoides, le proporciona a la fracción una característica de tres efectos en uno, lo cual favorece la idea de encontrar un tratamiento que sea efectivo contra los diferentes eventos patológicos del SNC, sin provocar tantos efectos secundarios no deseables.

8 Conclusiones

El extracto hidroalcohólico de *B. ternifolia* (BtHA) ha demostrado actividad importante contra padecimientos asociados al SNC, como la pérdida de memoria, ansiedad y depresión, lo cual deja la base para seguir realizando estudios sobre esta nueva línea, con esta planta.

El ácido ursólico, en conjunto con los flavonoides quercetina y escopoletina, es el responsable de la actividad anti-inflamatoria de BtHA.

Los flavonoides encontrados en Fr-AcOEt, son los responsables de la actividad antioxidante.

El ácido clorogénico y el ácido ursólico son los compuestos responsables de la actividad anti-AChE y por ende pueden ser los responsables de la actividad nootrópica de BtHA.

Los compuestos presentes en Fr-AcOEt del primer fraccionamiento de BtHA son los principales responsables de la actividad contra los eventos patológicos relacionados con la EA.

9 Perspectivas

Dentro de los estudios que podrían realizarse en un futuro cercano, se encuentran la evaluación de Fr-AcOEt y Flav 3 en los modelos de PEP, LEC y NF, para indagar si los compuestos identificados en este trabajo también son los responsables de estas propiedades.

Así mismo, podría realizarse una investigación para determinar si los compuestos identificados en este trabajo, tienen alguna actividad directa sobre la expresión de los ARNm de las citocinas proinflamatorias, mediante las técnicas de extracción de ARN y PCR en Tiempo Real.

10 Bibliografía

Aguilar-Contreras A., Camacho-Pulido J. R., Jacquez-Ríos P., López-Villafranco M. E. 1998. 1ª edición. Plantas Medicinales del Herbario IMSS, Su Distribución por Enfermedades; pp: 94.

Aguzzi A., Barres B., Bennett M. 2013. Microglia: Scapegoat, saboteur or something else? *Science*; 339: 156-161.

Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G. M., Cooper N. R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B. L. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease; *Neurobiol. Aging* 21: 383–421.

Almeida L F., Fernandez E., Lima J L., Valentao P., Andrade P B., Seabra R M., Costa P C., Bahia M F. 2009. Oxigen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. *J Med Food*; 12: 175-183.

Altinier G., Sosa S., Aquino R P. Mencherini T. 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55:1718-1723.

Alzheimer's Association. 2012. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*; 8:131-168.

Anstey K J., Cherbuin N., Budge M. 2011. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev*; 12: e437.

Anstey K J., Mack H A., Cherbuin N. 2009. Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am J Geriatr Psychiatry*; 17: 542-555.

- Argueta, A. Cano, L. Rodarte, M., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México., pp: 1362-1363. ISBN: 968-29-7323-6.
- Arnaíz-Villena A., Regueiro J R., Larrea C R. 1995. Inmunología. Editorial Complutense. España; pp167.
- Auerbach J. M. and Segal M. 1994. A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Neurophysiology*; 72: 2034-2040.
- Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaru A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*; 75:125-132.
- Baquero M., Blasco R., Campos-García A., Garcés M., Fages E. M., Andreu-Català M. 2004. Estudio descriptivo de los trastornos conductuales en el deterioro cognitivo leve. *REV NEUROL*; 38 (4): 323-326.
- Bernatoniene J., Masteikova R., Majiene D., Savickas A., Kevelaitis E., Bernatoniene R., Dvorackova K., Civiskiene G., Lekas R., Vitkevicius K., Peciura R. 2008. Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina (Kaunas)*; 44: 706-712.
- Beydoun M. A., Beydoun H. A., Wang Y. 2008. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analyses. *Obes Rev*; 9: 204-218.
- Bhatia N., Agarwal C., Agarwal R. 2001. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin and epigallocatechin 3-gallate on

mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr. Cancer*; 39: 292-299.

Bishnoi M., Chopra K., Kulkarni S. K. 2007. Protective effect of rutin a polyphenolic flavonoid against haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes. *Fundam Clin Pharmacol*; 21: 521-529.

Brunton L. L., Lazo J. S., Parker K. L. (Eds.). 2006. *Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*, 11th ed. McGraw-Hill. New York.

Burghardt N. S., Sullivan M. G., McEwen B. S. 2004. The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: A comparison with tianeptine. *Biol. Psychiatry*; 55 (12): 1171.

Chattopadhyay D., Arunachalam G., Mandal A. B., Sur T. K. 2002. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal Ethnopharmacology*; 82: 229-237.

Checker R., Sandur S. K., Sharma D., Patwardhan R. S., Jayakumar S., Kohli V., Sethi G., Aggarwal B. B., Sainis K. 2012. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE*; 7(2): e31318.

Chitnis M. P., Adwankar M. K. 1986. Enhancement of the in vitro cytotoxicity of bouvardin by verapamil alone and combined with hyperthermia in Sarcoma 180 and Ehrlich ascites carcinoma cells. *Journal Cancer Research and Clinical Oncology*; 112 (2): 131-134.

- Cho S. O., Ban J. Y., Kim J. Y., Jeong H. Y., Lee I. S., Song K. S., Bae K., Seong Y. H. 2009_a. *Aralia cordata* protects against amyloid beta protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured neurons and has antimentia activities in mice. *J. Pharmacol. Sci*; 111: 22-32.
- Cho S. O., Ban J. Y., Kim J. Y., Ju H. S., Lee I. S., Song K. S., Bae K., Seong Y. H. 2009_b. Anti-ischemic activities of *Aralia cordata* and its active component, oleanolic acid. *Arch. Pharm. Res.*; 32:923-932.
- Chun S., Jun L., Fengming W., David T. Y. 2010. *Ginkgo biloba* Extract in Alzheimer's Disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. *International Journal Molecular Sciences*; 11: 107-123.
- Chung Y. K., Heo H. J., Kim E. K., Kim H. K., Huh T. L., Lim Y., Kim S. K., Shin D. H. 2001. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum mejorana* L on the acetylcholinesterase. *Mol Cells*; 11: 137-143.
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.
- Cornejo-Garrido J., Chamorro Cevallos G. A., Garduño Siciliano L., Hernández Pando R., Jimenez Arellanes M. A. 2012. Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas*; 11(1): 91-102.
- Crews, L. Mashlia, E., 2010. Molecular Mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*; 19(R1): R12-R20. doi: 10.1093/hmg/ddq160; PMID: PMC2875049.

- dal Belo S. E., Gspar L. R., Maia Campos P. M. B. G., Marty J. P. 2009. Skin penetration of epigallocatechin 3-gallate and quercetin from green tea and *Ginkgo biloba* extracts vehiculated in cosmetic formulations. *Skin Pharmacol Physiol*; 22:299-304.
- Darryl, P. MD. FACP., 2005. Treatments for Alzheimer Disease. *South Med J.*; 98(6):628-635. ISSN: 0038-4348.
- David, D.J. Renard, C.E. Jolliet, P. Hascoët, M. Bourin, M., 2003. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)*, 166(4): 373-382. 10.1007/s00213-002-1335-4; PMID: 12601501.
- Daviglus M. L., Bell C. C., Berrettini W. 2010. National Institutes of Health State-of-the-Science. Conference statement: preventing Alzheimer disease and cognitive decline. *Ann Intern Med*; 153: 397-405.
- de Calignon A., Fox L. M., Pitstick R., Carlson G. A., Bacskai B. J., Spires-Jones T. L., Hyman B. T. 2010. Caspase Activation precedes and leads to tangles. *Nature*; 464: 1201-1204.
- Deepak M., Handa S. S. 2000. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytotherapy Research*; 14:463-465.
- Diaz A. M., Abad M. J., Fernandez L., Recuero C. 2000. In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phyllyrea latifolia* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 23: 1307-1313.
- Dos Santos M. D., Almeida M. C., Lopez N. P., De Sousa G. E. P. 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogénic acid. *Biol Pharm Bull*; 29:2236-2240.

- Ellman G. L., Courtney V., Andres Jr. R. M. 1961. Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *BiochemPharmacol*; 7: 88-95.
- Fan Y. M., Xu L. Z., Gao J., Wang Y. 2004. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia*; 75:253-260.
- Feng R. T., Lu Y. J., Bowman L. L. 2005. Inhibition of activator protein -1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem*; 280:27888-27895.
- File, S.E. Mabbutt, P.S. Hitchcott, P.K., 1990. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*., 102 (1): 98-101. PMID: 1975449.
- Flores Soto M. E., Segura Torres J. E. 2005. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*; 6(4):315-326.
- Formica J. V., Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*; 33:1061-1080.
- Garcia S., Coral R. M., Meza E., Lucino J., Martínez B., Villagómez A de J. 2009. Enfermedad de Alzheimer: una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular. *Medicina Interna de México*; 25 (4): 300-312.
- García-Morales G. 2008. Evaluación Farmacológica de la Actividad Anti-Alzheimer de *Bouvardia ternifolia*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- García-Morales G. 2010. Efecto Inhibidor de acetilcolinesterasa por extractos de *Bouvardia ternifolia* cultivada en hidroponía. Tesis de Maestría, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional.
- Goldsby R. A., Kindt T. J., Osbone B. A., Kuby J. 2004. Inmunología. 5a ed. México D.F., McGraw-Hill Interamericana.
- Gonzales, M. R., 2005. Enfermedad de Alzheimer clínica, tratamiento y rehabilitación. 1ª Edn. Barcelona España. Masson; pp: 103. ISBN 84-458-0858-3.
- Gosselin D., Rivest S. 2007. Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr Jekyll/Mr Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav Immun*; 21: 281–289.
- Green R. C., Cupples L. A., Go R., Benke K. S., Edeki T., Griffith P. A. 2002. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA*. 287; 329-336.
- Gutteridge J. M. 1986. Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun*; 1 (3): 173-84.
- Gross C., Hen R. 2004. Genetic and Environmental Factors Interact to influence anxiety. *Neurotoxicity Research*; 6:494-501.
- Hamer M., Chida Y. 2009. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol Med*; 39: 3-11.
- Hardman J., Limbird L. (Eds.). 2003. Goodman&Gilman's. Las bases farmacológicas de la terapeutica. 10ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

Heo H. J., Cho H. Y., Hong B., Kim H. K., Heo T. R., Kim E. K., Kim S. K., Kim C. J., Shin D. H. 2002. Ursolic acid of *Origanum majorana* L reduces Abeta-induced oxidative injury. *Mol Cells*; 13: 5-11.

Herrera-Ruiz M., García-Morales G., Zamilpa A., Gonzalez-Cortazar M., Tortorielo J., Ventura-Zapata E., Jiménez-Ferrer E. 2012. Inhibition of acetylcholinesterase activity by hidroalcoholic extract and their fractions of *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Shcldtl (Rubiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. In Press.

Hosman C., Jané-Llopis E., Saxena S. 2001. Prevención y promoción en salud mental: evidencia e investigación. OMS Ginebra, Departamento de Salud Mental y Adicción a Sustancias.;

Hosman C., Jané-Llopis E. 2005. Efectividad y evidencia: niveles y perspectivas. En: Prevención de trastornos mentales: intervenciones efectivas y opciones de políticas. Oxford, Oxford University Press.

Hollman P. C. H., Batan M. B. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacotherapy*; 51: 305-310.

<http://www.sersame.salud.gob.mx> visitado el 18 de febrero del 2015.

Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H. 2008. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol Nutr Food Res*; 52: 26–42.

Instituto Mexicano del Seguro Social. 2007. Comunicado de la Coordinación de Comunicación Social. No. 368.

- Ismaili H., Tortora S., Sosa S., Fkih-Tetohuani S. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Thymus wilddenowii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 53: 1645-1652.
- Ito H., Sun X. L., Watanabe M., Okamoto M., Hatano T. 2008. Clorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 72: 885-888.
- Jacob Pollier, Alain G. 2012. Molecules of interest oleanolic acid. *Phytochemistry*; 77: 10-15.
- Jellinger K. A., Attems J. 2007. Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J. Neurol*; 257:80-87.
- Jiménez-Ferrer E. Reynosa-Zapata I, Pérez-Torres Y. Tortoriello J., 2005. The secretagogue effect of the poison from *Centruroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and the antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia* extract. *Phytomedicine.*,12: 65-71. PMID:15693710.
- Jolad S. D., Hoffman J. J., Torrance J., Wiedhopf A. M., Cole J. A., Arora S. K., Bates A. B., Gargiulo A. L., Kriek G. A. 1977. Bouvardin and Deoxybouvardin, Antitumor Cyclic Hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J. Am. Chem. Soc.*; 99: 8040-8044.
- Kamalakkannan N. Stanely Mainzen Prince P. 2006. Rutin improves the antioxidant status in streptozotoin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem*; 293: 211-219.
- Kamer A.R., Craig R.G., Dasanayake A.P., Brys M., Glodzik-Sobanska L., de Leon M. J. 2008. Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's & Dementia*; 4: 242-250.

- Kang S. Y., Sung S. H., Park J. H., Kim Y. C. 1998. Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyratum*. *Arch. Pharm Res.*; 21:718-722.
- Karasu T. B. 2000. Practical guideline for the treatment of patients with major depressive disorders. *Am. J. Psychiatry*; 150 (4): 1123-1125.
- Kessler R. C., Chiu W. T., Demler O. 2005. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*; 62(6): 617–627.
- Kim H. J., Jang S. I., Kim Y. J., Chung H. T., Yung Y. G., Kang T. H. 2004. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia*; 75:261-266.
- Kim K. H., Lee K. W., Kim D. Y., Park H. H., Kwon I. B., Lee H. J. 2005. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresour Technol*; 96:1709-1712.
- Kim S. S., Park R. Y., Jeon H. J., Kwon Y. S., Chun W. 2005. Neuroprotective effect of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytoter. Res.*; 19: 243-245.
- Kimura T., Fukuda T., Sahara N., Yamashita S., Murayama M., Mirozoki T., Yoshiike Y., Lee B., Sotiropoulos I., Maeda S. 2010. Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neural loss but not in synaptic loss. *The journal of biological chemistry*; 285: 38692-38699.
- Kitazawa M., Yamasaki T.R., LaFerla F.M. 2004. Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Ann. N Y Acad. Sci.*; 1035: 85–103.

- Ki-Yeol Y. So-Young Park. 2012. Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics. *Molecules*; 17: 3524-3538.
- Koda T., Kuroda Y., Imai H. 2009. Rutin supplementation in the diet has protective effects against toxicant-induced hippocampal injury by suppression of microglial activation and pro-inflammatory cytokines: protective effect of rutin against toxicant-induced hippocampal injury. *Cell Mol Neurobiol*; 29:523-531.
- Konsman J. P., Drukarch B., Van Dam A. M. 2007. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *ClinSci (Lond)*; 112: 1–25.
- Kristofikova Z., Ripova D., Bartos A., Bockova M., Hegnerova K., Ricny J., Cechova L., Vrajova M., Homola J. 2013. Neuroinflammation and complexes of 17 β -Hydrosteroid Dehydrogenase type 10-Amyloid β in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Disease*; 10 (2): 165-173.
- Lee R., Margaritis M., Channon K. M., Antoniadis C. 2012. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Current Medicinal Chemistry*; 19: 2504-2520.
- Liu J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*; 49: 57–68.
- López Piñero J. M. 2002. *Medicina en la Historia*. Editorial Esfera de los libros S.L. 1ª edición. pp 34-35.
- Lu F. P., Lin K. P., Kuo H. K. 2009. Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*; 4:e4144.

- Mangone C. A. 1999. Etiopatogenia y fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer Rev. NeurolArg.; 24 (1): 21-25.
- Mass M., Petereit F., Hensel A. 2009. Caffeic acid derivates from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*; 14: 36-45.
- Massoulié J., Millard C. B. 2009. Cholinesterases and the basal lamina at vertebrate neuromuscular junction. *Curr Opin Pharmacol*; 9(3)316-325.
- Medina-Mora M. E., Borges G., Lara C., Benjet C., Blanco J., Fleiz C., Villatoro J., Rojas E., Sambrano J., Casanova L., Aguilar-Gaxiola S. 2003. Prevalence of mental disorders and use of services: Results from the Mexican National Survey of Psychiatric Epidemiology. *Salud Mental*; 26(4):1-16.
- Melik E, Dubil R. A, Pound M. W., 2014. Duration of therapy with acetylcholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease as reported in the literature. *Consult Pharm.*, 29(6): 400-407. doi: 10.4140/TCP.n.2014.400.; PMID: 25202893.
- McIntyre K. L., Harris C. S., Saleem A., Beaulieu L. P., Ta C. A., Haddad P. S., Arnason J. T. 2009. Seasonal phytochemical variation of anti-glycation principles in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*). *Planta Med.*; 75; 286-292.
- Meng X., D'Arcy C. 2012. Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: a systematic review with meta-analyses and qualitative analyses. *PLoS One*; 7: e38268.

- Meotti F. C., Ardenghi J. V., Pretto J. B., Souza M. M., de' Avila M. Junior A. C. 2006. Antinociceptive properties of coumarines, steroid and dihydrostyryl-2-pirone from *Poligala sabulosa* (Poligalaceae) in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*; 58: 107-112.
- Mesulam M. 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer`s disease: pivotal factor or side show?. *Learn Mem.*; 11(1): 43-49.
- Miceli N., Taviano M. F., Giuffrida D., Trovato A. 2005. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpi* Bentham. *Journal Ethnopharmacology*; 97: 261-266.
- Milkani E., Lambert C., McGimpsey W. 2011. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-bases surface plasmon resonance sensor. *Analytical Biochemistry*; 408: 212-219.
- Moon P. D., Lee B. H., Jeong H. J., An H. J., Park S. J., Kim H. R. 2007. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the IkappaB/NF-kappaB signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur. J. Pharmacol*; 555: 218-225.
- Muñoz-Ruiz P., Rubio L., García-Palomero E., Dorransoro I., del Monte-Millán M., Valenzuela R., Usán P., de Austria C., Bartolini M., Andrisano V., Bidon-Chanal A., Orozco M., Luque F.J., Medina M., Martínez A. 2007. Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J Med Chem*; 48(23): 7223-7233.
- Muschietti L., Gorzalezany S., Ferraro G., Acevedo C., Martino V. 2001. Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Med.*; 67: 743-744.

- Nacitarhan S., Ozben T., Tuncer N. 1995. Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia. *Free Radic Biol Med*; 19 (6): 893-6.
- Nagano S., Huang X. D., Moir R. M., Payton S. E., Tanzi R., Bush A. 2004. Peroxidase activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) cross-links β -amyloid (A β) and generates A β -COX-2 hetero-oligomers that are increased in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*; 279:14673-14678.
- Namba T., Matsue T. 2002. A historical study of coffee in Japanese and Asian countries: focusing the medicinal uses in Asian traditional medicines. *Yakushigaku Zasshi*; 37: 65-75.
- Nash J., Nutt D. 2004. Antidepressivos. *Psiquiatría* 6 (7):289-294.
- Neafsey E. J., Collins M. A. 2011. Moderate alcohol consumption and cognitive risk. *Neuropsychiatry Dis Treat*; 7: 465-484.
- Nikajima Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. 2007. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci.*; 80: 370-377.
- Ninan P. 1999. The Functional Anatomy, Neurochemistry and Pharmacology of Anxiety. *J. Clin Psychiatry*; 22:12-17.
- Norman G., Brooks S.P., Hennebry G.M., Eacott M.J., Little H.J. 2002. Nimodipine prevents scopolamine-induced impairments in object recognition. *J Psychopharmacol*; 16 (2):153-61.

- Novotný L., Vachálková A., Biggs D. 2001. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. Minireview. *Neoplasma*; 48 (4):241-246.
- Organización Mundial de la Salud. 1992. CIE 10 Trastornos mentales y del comportamiento. Madrid, España: Meditor.
- Organización Mundial de la Salud. 2004. Prevención de los trastornos mentales. Intervenciones efectivas y opciones políticas. Ginebra. pp 16-17.
- Ownby R. L., Crocco E., Acevedo A. 2006. Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis, and metaregression analysis. *Arch Gen Psychiatry*; 63: 530-538.
- Panda S. Kar A. 2006. Evaluation of the antithyroid, antioxidative and antihyperglycemic activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in hyperthyroid rats. *Phytoter Res*; 20:1103-1105.
- Park J. H., Son K. H., Kim S. W., Chang H. W. 2004. Anti-inflammatory activity of *Synurus deltoides*. *Phytotherapy Research*; 18: 930-933.
- Pekal A., Biesaga M., Pyrzynska K. 2011. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals. *Biometals*; 24: 41-49.
- Pellow, S. File, S.E. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, 24:525-529. doi:10.1016/0091-3057(86)90552-6; PMID: 2871560.
- Pérez G. R. M., Perez G. C., Perez G. S., Zavala S. 1998. Effect of triterpenoid of *Bouvardia ternifolia* in blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine*; 5: 475-478.

- Perlson E., Maday S., Fu M. M., Moughamian A. J. Holzbaur E. L. 2010. Retrograde axonal transport: pathways to cell death?. *Trends in Neurociences*; 33: 335-334.
- Peters R., Peters J., Warne J. 2008. Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systemic review. *Age Ageing*; 37: 505-512.
- Petit-Demouliere, B. Chenu, F. Bourin, M., 2005. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*., 177 (3): 245-255. 10.1007/s00213-004-2048-7; PMID: 15609067.
- Plassman B. L., Williams J. W. Jr., Burke J. R. 2010. Systematic review: factors associated with risk for and possible prevention of cognitive decline in later life. *Ann Intern Med.*; 153: 182-193.
- Posada-Villa J.A., Buitrago-Bonilla J.P., Medina-Barreto Y., Rodriguez-Ospina M. 2006. Trastornos de ansiedad según por distribución por edad, género, variaciones por regiones, edad de aparición, uso de servicios, estado civil y funcionamiento/discapacidad según el Estudio Nacional de Salud Mental-Colombia. *Nova- publicación científica-INSS*. 4(6): 33-41.)
- Proffeno L. A., Porsteinsson A. P., Faraone S. V. 2010. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry*; 67: 505-512.
- Prut, L. Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*., 463 (1-3): 3–33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X; PMID: 12600700.

- Pu F., Mishima K., Irie K., Egashira N., Ishibashi D., Matsumoto Y. 2005. Differential effects of *buckwheat* and *kudingcha* extract on neuronal damage in cultured hippocampal neurons and spatial memory impairment induced by scopolamine in an eight-arm radial maze. *J Health Sci*; 51: 636-644.
- Ramirez-Bermudez J. 2012. Alzheimer's disease: Critical notes on the history of a medical concept. *Archives of Medical Research*; 43: 595-599.
- Recio M. C., Giner R. M., Manez S., Gueho J. 1995. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta medica*; 61:9-12.
- Richmond J. E., Jorgensen E. M. 1999. One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci*; 2: 791-7.
- Ringbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L. 1998. Ursolic acid from *Plantago major*, selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*; 61: 1212-215.
- Ryu S. Y., Oak M. H., Yoon S. K., Cho D. I., Yoo G. S. 2000. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med* 66: 358–360.
- Sandford J. J., Spilios V. A., Nutt D. J. 2000. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 1. Basic neurobiology. *Pharmacol Ther*; 88:197-212.
- Sanderson K. J., van Rij A. M., Wade C. R., Sutherland W. H. 1995. Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking and in peripheral vascular disease. *Atherosclerosis*; 118 (1): 45-51.

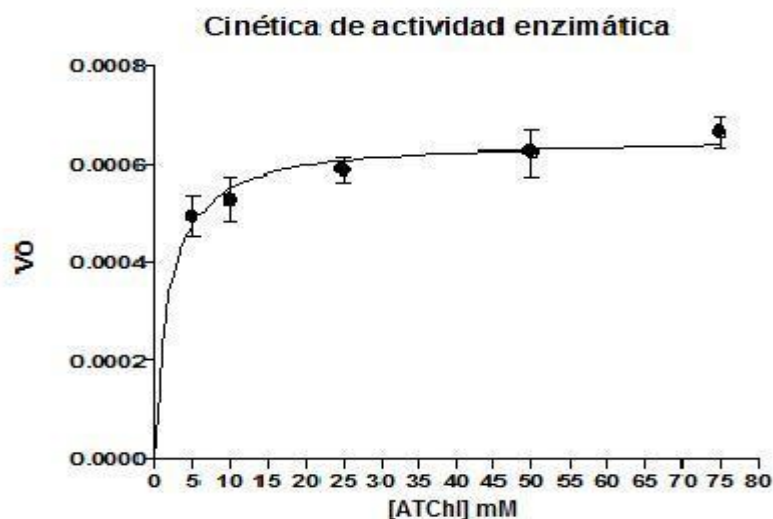
- Saravanan R., Pugalendi V. 2006. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. *Pharmacological Reports*; 58: 41-47.
- Schneider J. A., Arvanitakis Z., Bang W., Bennet D. A. 2007. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*; 69:2197-2204.
- Serrano-Pozo A., Frosch M. P., Masliah E., Hyman B. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in medicine*; 1: 1-21.
- Sharp E. S., Gatz M. 2011. Relationship between education and dementia: an updated systematic review. *Alzheimer Dis AssocDisord*; 25:289-304.
- Shivanand D., Hoffman J. J., Torrence S. J., Wiiedhopf R. M., Cole J. R., Arora S. K., Bates R.B., Gargiudo R. I., Kierk G. R. 1977. Bouvardin y deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J Am ChemSoc* ; 99 : 8040-8044.
- Silman I., Sussman J L. 2008. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *ChemBiol Interact*; 175 (1-3):3-10.
- Silva B. A., Dias A. C., Ferreres F., Malva J. O., Oliveira C. R. 2004. Neuroprotective effect of *H. perforatum* extracts on beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Neurotox. Res.*; 6: 119-130.
- Small S. A., Mayeux R. 2000. Delirium and dementia. In: Lewis PR, EDITORS. *Merrit's neurology*. Philadelphia , PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sofi F., Valecchi D., Bacci D. 2011. Physical Activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med*; 269: 107-117.

- Su J. H., Cummings B. J., Cotman C. W. 1993. Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res* 625: 228–237.
- Subbaramaiah K., Michaluart P., Sporn M. B., Dannenberg A. J. 2000. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Research*; 60: 2399-2404.
- Suh N., Honda T., Finlay H. J., Barchowsky A., Williams C. 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res* 58: 717–723.
- Sussman J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. Silman I. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*; 253: 872-979.
- Tanaka Y., Sakurai M., Hayashi S. 1989. Effect of scopolamine and HP029, a cholinesterase inhibitor, on long-term potentiation in hippocampal slices of guinea pig. *Neuroscience Letters*; 98: 179-183.
- Tien-Ning C., Jeng-Shyan D., Yi-Chih C., Chao-Ying L., Liao Jung-Chun., Min-Min L., Wen Huang P., Shyh-Shyun H. and Guan-Jhong H. 2012. Ameliorative effects of scopoletin from *Crossostephium chinensis* against Inflammation pain and its mechanisms in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2012: 1-10.
- Tobey R. A., Orlicky D. J., Deaven L. L., Real L. B., Kissane R. J. 1978. Effects of Bouvardin (NSC 259968), a cyclic hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*, on the progression capacity of cultured Chinese Hamster. *Cancer Research*; 38: 4415-4421.

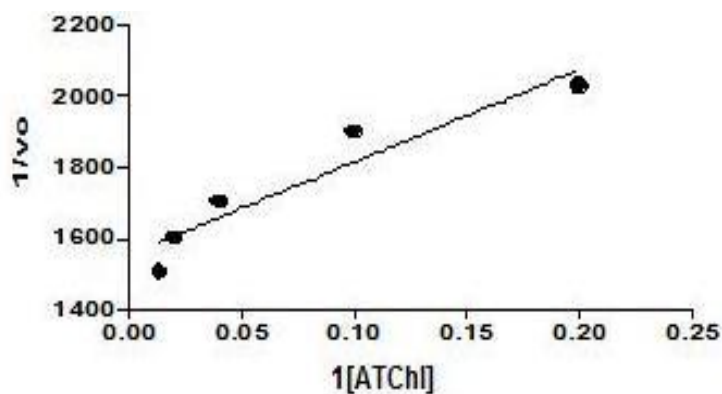
- Tsai S. J., Yin M. C. 2008. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J Food Sci*; 73: H174–178.
- Uriarte Bonilla V. 2009. *Psicofarmacología*. 6ª edición, Editorial Trillas, México. pp 139-151.
- Valencia C. M. 2007. Trastornos Mentales y Problemas de Salud Mental. Día Mundial de la Salud Mental. *Salud Mental*; 30:75-80.
- Valério D. A., Georgety S. R., Magro D. A., Casagrande R., Cunha T. M., Vicentini F. T. M. C., Vieira S. M., Fonseca M. J. V., Ferreira S. H., Cunha F. Q., Verri W. A. 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J. Nat. Prod.*; 72: 1975-1979.
- Viswanathan A., Rocca W. A., Tzourio C. 2009. Vascular risk factors and dementia: how to move forward?. *Neurology*; 72:368-374.
- Wagner C., Vargas A. P., Roos D. H. Morel A. F., Farina M., Nogueira C. W., Aschner M., Rocha J. B. 2010. Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives of quercetin and rutin against methylmercury (MgHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Arch Toxicol*; 84: 89-97.
- Wang X., Ye X., Liu R., Chen H-L., Bai H., Liang X., Zhang X-D., Wang Z., Li W-L., Hai C-X. 2010. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases; *Chem Biol Interact*; 184: 328-337.
- Wilkinson K., Boyd J D., Glicksman M., Moore K J., El Khoury J. 2011. A high content drugs screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36. *Journal of Biological Chemistry*; 236: 34914-34922.

- World Alzheimer Report, 2009. London: Alzheimer's Disease International.
- Woodcock T., Morganti-Kossmann M. C. 2013. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in Neurology*; 4 (18): 2-18.
- Wyss-Coray T., Rogers J. 2012. Inflammation in Alzheimer disease-A brief review of the basic science and clinical literature. *Cold spring harb perspectives in medicine*; 2: 1-23.
- Xiujuan Y., Zuoqi D., Yufeng X., Zhifeng W., Yubin L., Carlos F., Yue D. 2012. Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by scopoletin and underlying mechanisms. *International Immunopharmacology*; 14: 454-462.
- Yagi K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol.*; 108: 101-6.
- Young J. M., De Young L. M. 1989. *Modern methods of pharmacology: pharmacological methods in the control of inflammation*. Ed. by Chang J. Y. Lewis A. J. Alan It Lies Inc., New York.
- Zjorumski C. F., Isenberg Ke. 1991. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *Am J Psychiatry*; 148:162-173.

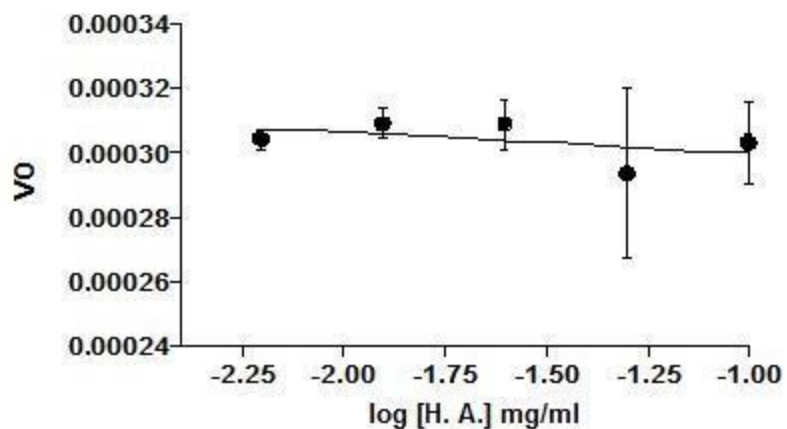
11 Anexos



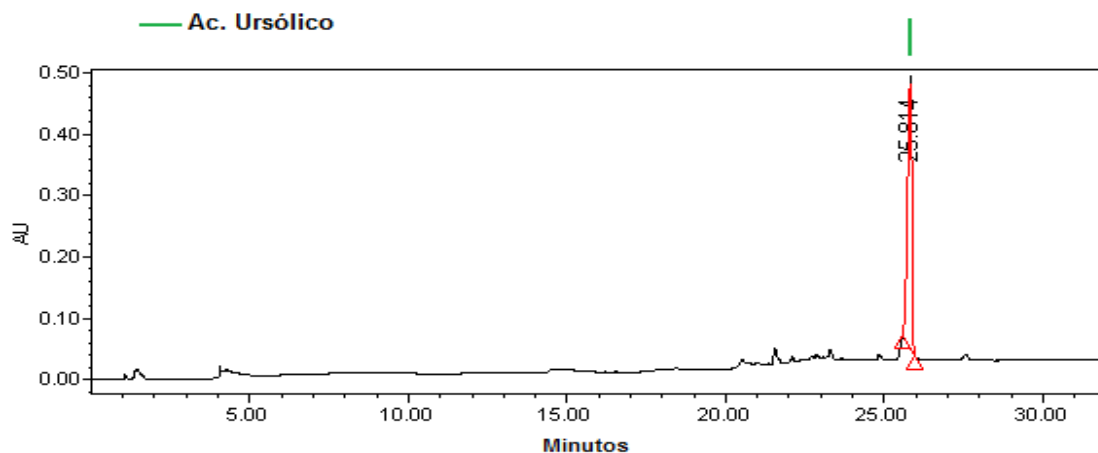
Anexo 1.- Cinética que representa el comportamiento hiperbólico de la actividad enzimática sin inhibidor y que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten. En el eje de las (X) se encuentran las concentraciones de ATChI (5, 10, 25, 50 y 75mM); en el eje de las (Y) se encuentra la velocidad inicial de la reacción en mmol/min (+/-D.E.).



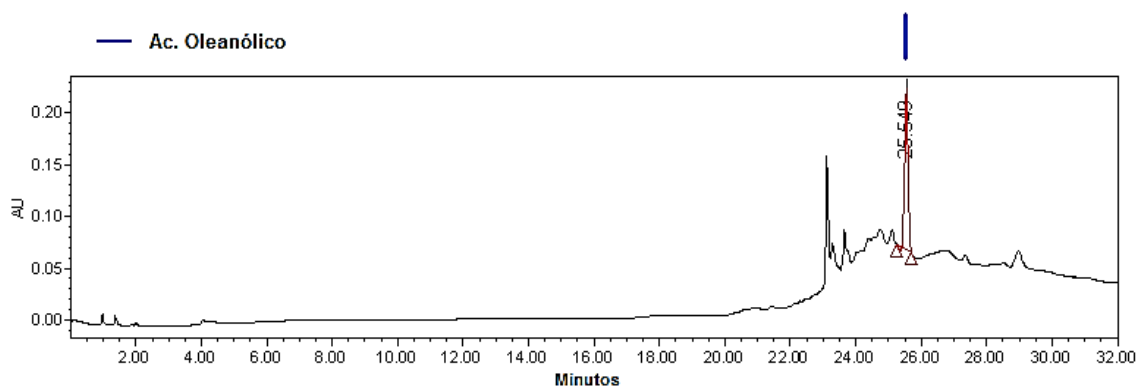
Anexo 2.- Gráfica que representa la transformación de las dobles recíprocas de la concentración de sustrato 1/[ATCh] contra el inverso de la velocidad inicial 1/V₀ según el modelo de Lineawer-Burk con las cuales se calcularon las constantes cinéticas K_m y V_{max}.



Anexo 3.- Gráfica que muestra el comportamiento de las diferentes concentraciones de BtHA en logaritmo (0.00625, 0.00125, 0.0025, 0.05 y 0.1 mg/ml)



Anexo 4.- Cromatograma del ácido ursólico usado como control para el análisis en HPLC de las fracciones de BtHA.



Anexo 5.- Cromatograma del ácido oleanólico usado como control para el análisis en HPLC de las fracciones de BtHA.

For Asia

Science Alert
20 Cecil Street No. 14-01
Equity Plaza, Singapore 049705
Fax: +65 67 22 06 18

For North America

Science Alert
244, 5th Avenue, No. 2218,
NY 10001, New York, USA
Fax: +1-888-777-8532

For UK & Europe

Science Alert
26 York Street
London, W1U 6PZ, UK
Fax: +44-208-196-2333

Dr. Enrique Jiménez Ferrer,
nill

Subject: Acceptance Letter for Article No. 69643-IJP-ANSI

It is to notify that your recent submission entitled Antidepressive, Anxiolytic and Nootropic Effect of Bouvardia ternifolia for publication in *International Journal of Pharmacology* has been examined/reviewed by the Internal Editors and found it suitable for further processing.

Regards

Dr. Enrique Jiménez Ferrer,
nill

Subject: Publication/Processing cost for Article No. 69643-IJP-ANSI

Dear Dr. Enrique Jiménez Ferrer,

As you know that Internal Reviewer accepted your Article No. 69643-IJP-ANSI entitled Antidepressive, Anxiolytic and Nootropic Effect of Bouvardia ternifolia for further processing.

Before further processing, it is mandatory to pay publication/processing cost of this article. Therefore, I would like to request you to please pay publication/processing cost immediately.

To know the exact amount you should pay and the methods of payment, please generate invoice for this article.

Your quick response in this regard will help us to complete the publication process as early as possible.

Regards

M. Imran Pasha
Publication Manager

Antidepressive, Anxiolytic and Nootropic Effect of *Bouvardia ternifolia*.

**García-Morales G^{a,b,c}, Noguerón-Merino MC^{a,b,c}, Herrera-Ruiz M^a, González-Cortazar M^a,
Lombardo-Earl G^a, Román-Ramos R^c, Aguilar Rojas Arturo^a, Jiménez-Ferrer E^a.**

^aCentro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina No. 1, C.P. 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico.

^bPrograma de Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma

Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa,

México D.F., Mexico ^cDepartamento de Farmacología, Universidad Autónoma Metropolitana-

Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa, México D.F., Mexico.

Corresponding author: enriqueferrer_mx@yahoo.com

Key words: *Bouvardia ternifolia*, anxiety, depression, memory, flavonoids, terpenes, coumarins.

Abstract

In Mexico the root and aerial parts of the species *Bouvardia ternifolia* have extensive traditional medical uses in treating disorders of the central nervous system, such as an antidote for scorpion stings and snakebites intoxication.

No studies exist on the pharmacological evaluation regarding the central nervous system effects attributed to this plant, therefore the aim of this work was to use different behavioural models to measure the antidepressant effect (forced swimming test), anxiolytic (elevated plus-maze), sedative (locomotor activity in the open field test) and memory (passive avoidance task) oral administration of the hydroalcoholic extract of aerial parts of *Bouvardia ternifolia*, to ICR male mice.

Through high-resolution liquid chromatography it was possible to quantify part of the chemical composition of the hydroalcoholic extract of *Bouvardia ternifolia* (mg/g of extract); quercetin glycoside (9.73), ursolic acid (15.73), scopoletin (3.23) and chlorogenic acid (0.16). In other trials it was also observed that hydroalcoholic extract of *Bouvardia ternifolia* induces an antidepressant effect at 500 mg/kg dose, causing a decrease in anxiety without sedation activity, from a dose of a 100 up to 500 mg/kg without showing a dose-dependent effect. Furthermore, the extract was able to improve memory retention parameter of the mice receiving scopolamine in the passive avoidance task throughout a dose-dependent behaviour, starting at 100 mg/kg ($ED_{50} = 281.5$ mg/kg and $E_{max} = 768.8$ mg/kg). It is necessary to monitor the chemical and pharmacological activity that enables the identification of the mode of action by which this medicinal species exerts its effects on the central nervous system.

Key words: *Bouvardia ternifolia*, anxiety, depression, memory, flavonoids, terpenes, coumarins.

Introduction

Neurological disorders are a serious public health problem worldwide with a high social cost. It affects people regardless of age, sex, cultural or socio-economic level and are responsible for four of the six leading causes of years lived with disability. In 2008, WHO reported that 450 million people worldwide suffer from some neurological disorder, which represents 12% of the total of prevalent diseases (Organización Mundial de la Salud, 2004). It is estimated that one in four families has at least one member affected by neurological disorders such as depression, anxiety, schizophrenia and dementia such as Alzheimer's disease (AD); they are all closely related to the progressive degeneration of the limbic system, neocortex and anterior basal brain regions (Crews and Masliah, 2010). Current drug treatment to counteract the symptoms associated with mental disorders, are based on the prescription of anxiolytics such as benzodiazepines (acting on the GABAergic system), antidepressants for instance a serotonin selective reuptake inhibitor (SSRI); for the case of dementing illnesses such as AD nootropics are administered, such as inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (Melik, Dubil and Pound, 2014).

These synthetic drugs despite their effectiveness, at medium and long term induce a decrease in the quality of life of patients, due to the presence of sleep disorders, motor incoordination, tolerance and addiction to benzodiazepine anxiolytics; sedation, weight loss, and sexual dysfunction, when given antidepressants; hepatotoxicity, severe headaches, nausea, vomiting, diarrhoea, dizziness and lethargy, mainly with treatments for AD, (Gonzales, 2005; Darryl, 2005). Consequently, a continuous search for new therapeutic resources is maintained, to have effective treatments to increase the prospect of a better life for the patients. Therefore, the study of medicinal plants based on their ethno-medical use has proven to be an excellent source of alternative therapies for the treatment of this type of diseases.

In this paper the pharmacological effect of *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltldl was evaluated using experimental models related to central nervous system (CNS) disorders. This species belongs to the family Rubiaceae. Common names in Mexico that are used are: "trompetilla", "mirto", "hierba del indio" *Tlacoxóchitl* (Nahuatl language) and *Yita Ticuay* (Mixtec language). In Mexican traditional medicine it has been attributed several properties, among which its used for the "nerves" (state of unrest in which it is usual to suffer insomnia, despair, anxiety), as well as for headache and as a sedative. Also it is used against local pain caused by a poisonous snakebite among other poisonous animals (Argueta, 1994; CONABIO, 2009).

There are few studies on the pharmacological activity of this medicinal species; it has been shown that the methanol and hexane root extract inhibit the effects associated with the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* venom toxicity in mice. It was observed that the plant reduces extravasation and decreases pancreatic secretion of the amylase enzyme (Jimenez-Ferrer et al., 2005).

Furthermore, it was established that hydroalcoholic extract of *Bouvardia ternifolia* (BtHA) and its different fractions were able to inhibit the enzyme acetylcholinesterase activity *in vitro*, which is an important protein in the pathophysiology of AD. In these treatments the concentration of ursolic acid and the flavonoids: Rutin, quercetin and kaempferol (Garcia-Morales, 2010) were measured. From these compounds, it was determined that ursolic acid, is one of the major components of the extract and is possibly responsible for the anti-inflammatory activity reported for the plant (HerreraRuiz et al., 2012).

The aim of this study was to measure the effects of the hydroalcoholic extract of *Bouvardia ternifolia* at different dosages administered orally to mice that were exposed to different ethological models: forced swimming test (FST), elevated plus-maze (EPM), open field test (OFT) and passive avoidance task (PAT). In addition of performing the standardization of the extract based on its content of quercetin glycoside, ursolic acid, scopoletin and chlorogenic acid, using a high performance liquid chromatography (HPLC) technique.

2 Materials and methods

2.1.1. Plant material

The aerial parts of *Bouvardia ternifolia* were collected in the town of Coajomulco, Huitzilac

Morelos, Mexico; in the months of July and August 2010. The location of the plant was 19° 01 '37.94 "N; 99° 12 '39.57 "W at an altitude of 2589 m. The selected material was dried, in the dark at room temperature for two weeks. Subsequently, it was pulverized in an electric grinder (pulvexMexico) obtaining particles <4mm. Plant material was identified by Abigail Aguilar-Contreras, M.Sc., the IMSSM Herbarium Director (located in National Medical Center, Mexico City).

Voucher specimens were stored at this site for future reference (R-2010-1701-57).

2.1.2. Hydroalcoholic extract preparation

The dried plant material (1700 g) was macerated in 8 L of 60% ethanol for 24 hours at room temperature (23 °C ± 2). The extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator (Heidolph, Germany) at 50 °C, repeating this procedure three times consecutively, obtaining a hydroalcoholic extract (HA), finally it was dried by lyophilization process until a powder consistence was obtained and it was stored at 4 °C.

The hydroalcoholic extract of *Bouvardia ternifolia* (BtHA) was fractionated by liquid-liquid partition using an interface of water and ethyl acetate (Merck). Each phase was separately concentrated in a rotary evaporator, obtaining a soluble fraction in ethyl acetate (Fr-AcOEt) and one water-soluble. Subsequently, the aqueous fraction was partitioned with *n*-butanol (Merck), achieving soluble fraction in this solvent (Fr-BuOH) as well as an aqueous fraction (Fr-Aq).

2.1.3. BtHA Extract Analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The major compounds present in the BtHA were detected and quantified by an HPLC equipment was used. The equipment consists of a separation module (Waters® 2695) equipped with a diode array detector (Waters® 2996), operated with the Empower Chromatographic Manager Software ver. 1.0 (Waters). The stationary phase corresponded to a column Superspher® 100 RP-18 (120 x 4 mm; 5µM, Merck). The mobile phase consisted on water/acetic acid 1% as solvent A (OmniSolv, EMD) and acetonitrile as solvent B (OmniSolv, EMD) with a flow of 1 mL/min using a gradient system, the chromatographic method had a run time of 20 min, which was composed as follows: solvent A for the first two minutes remained at 100%, at minute 3 it decreased decreasing to 85%, at minute 7 to 72%, maintaining this concentration until minute 12, for the next two minutes the mixture decreased to 30% of solvent A, getting to minute 15 a change was made in the concentration gradient to a 100% of solvent B, which was maintained for one minute and finally from minute 17 to 20 the gradient shifted back to the initial conditions where solvent A was a 100%.

The wavelength at which the samples were monitored was 200-600 nm and the injection volume was 20 μ L. Quantification of the compounds was performed using a calibration curve constructed with commercial standards (Sigma, Aldrich, USA), of rutine and ursolic acid (Ruiz-Herrera et al., 2012), quercetin glycoside, chlorogenic acid and scopoletin.

2.2. Animals

For the pharmacological tests male Swiss albino ICR mice were used (purchased from Harlan, Mexico), with an average weight of 35 g each. These were placed in boxes of 8 mice each and kept in laboratory conditions at constant temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) with a 12h/12h light-dark cycle and free access to water and food (Harlan, Mexico). Before starting the experiments, the animals were maintained under these conditions for at least three weeks. Assays were performed between 8:00 am and 12:00 pm, in a soundproof room with light control. Mice management was carried out according to international standards norms and Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999, which refers to the use and care of experimental animals. The protocol was approved and registered within the local committee for health research, at the Mexican Social Security Institute (IMSS) with registration number 2007-1701-14.

2.3. Treatments

Drugs used as positive controls for each assay were administered intraperitoneally (ip) as follows: as an anxiolytic, Diazepam that is an allosteric modulator of GABA-A receptors (DZP, 1.0 mg/kg, Laboratorios Pisa SA de CV); as an antidepressant, imipramine as a non-selective serotonin recapture inhibitor (IMI, 15 mg/kg, Sigma-Aldrich, USA); as a nootropic, galantamine an inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase (GAL, 0.4 mg/kg, Sigma-Aldrich, USA). Scopolamine a nonselective muscarinic antagonist (ESC, 2.0 mg/kg, Sigma-Aldrich, USA), was used in the passive avoidance test as a temporary memory block.

The BtHA extract was administered at doses of 50, 100, 200 and 500 mg/kg and the vehicle used was distilled water (VEH, 100 μ L/10g, negative control), both were administered orally (o) through a intra-gastric cannula.

2.4. Ethological assay

2.4.1. Forced swimming test (FST)

The test is carried out in a glass cylinder (20 cm high x 12 cm diameter), filled with water up to 16 cm, at a temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Mice were submitted to a pre-swimming test for 15 minutes then were removed from the water, dried and brought to safety. After the pre-test an oral administration scheme was initiated, the treatments BtHA, IMI and VEH were administered 24, 18 and 1 h before the final evaluation. During the test, the time of immobility of each mouse was counted for 5 minutes. The purpose of this test is to induce behavioural learned helplessness, reflected as a decrease in mobility time.

2.4.2 Elevated plus-maze (EPM)

For this test, animals were administered with different dosages of BtHA, one hour prior to testing, for which an apparatus made of clear acrylic was used, it consists of two open arms (30 cm L x 5 cm W) and two closed arms (30 cm L x 5 cm W x 15 cm H), which have a height of 25 cm. The arms are extended from a central platform (5 cm x 5 cm) and the maze is elevated 50 cm from the ground. Each animal was placed in the centre of the maze facing one of the closed arms. The number of entries and time spent in open and closed arms were recorded for 5 min. Entry into an arm was defined as the animal's four legs were placed within either arms. All tests were recorded with a video camera (SONY Handycam DCR-SR47). After each test, the maze was carefully cleaned with a moist tissue dampen with a solution of 10% ethanol. The percentage of number of entries into the open arms (% EOA) and the percentage of time of permanence in the open arms (% TOA) were recorded.

2.4.3 Open field test (OFT)

In this assay, animals received treatment with BtHA 1 h before the test. The open field device was built with acrylic and black coloured floor divided into nine quadrants of 100 cm² each and transparent walls (30 cm L x 30 cm W x 15 cm H). The OFT was used to measure ambulatory activity, the subsequent parameters were measured to rule out a possible sedative effect of the drugs on the treated animals, considering the number of times the animal crosses each quadrant (TC) with all four legs and the number of rearing.

2.4.4. Passive avoidance task (PAT)

In this model a device consisting of two chambers, one illuminated and one dark, separated by a guillotine door is used; the base of the second chamber is a series of metal screens which are connected to a manually controlled (Panlab Cornella, LE872 model) electric source. The test consists of two phases, the first one is training, it involves placing the mouse in the illuminated chamber facing the dark chamber, the mouse explores 30 seconds and then the gate that separates the two chambers is opened, once it crosses over, the door automatically closes and an electrical discharge is applied of 0.6 mA for 2 seconds (Tra). On the second day (memory acquisition) the animals were exposed to the device and the acquirement of learning (Acq) was assessed immediately, BtHA, GAL and VEH treatments were administered every 24 hours for 4 consecutive days. All animals were trained and subsequently assigned randomly to a treatment group; a Basal group was also formed as a control, which only received VEH, this group did not received any other treatment. In the second phase (of the test) BtHA, GAL treatments and another VEH except the Basal group, were administered 1 h before the evaluation to each corresponding group. Thirty minutes after treatment application, the mice were administered 2.0 mg/kg *ip* of scopolamine (ESC). Half an hour later the final test began, by placing the mice in the passive avoidance camera without electrical stimulation. The indicative parameter of memory retention is the time (seconds) of escape latency from the illuminated chamber to the dark one.

2.5. Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm SD and analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test, establishing a significant difference when the p value was <0.05 , this statistical analysis was one using the SPSS 11.0 program.

3. Results

3.1 Yields and Analysis by HPLC of BtHA extract

From the extraction process it was obtained 118 g of dry weight of BtHA extract, obtaining a yield of 14.35% relative to the dried plant material. Chemical analysis by HPLC of BtHA allowed the identification of five compounds: quercetin glycoside, rutin, ursolic acid, scopoletin, and chlorogenic acid shown in Figure 1 and 2.

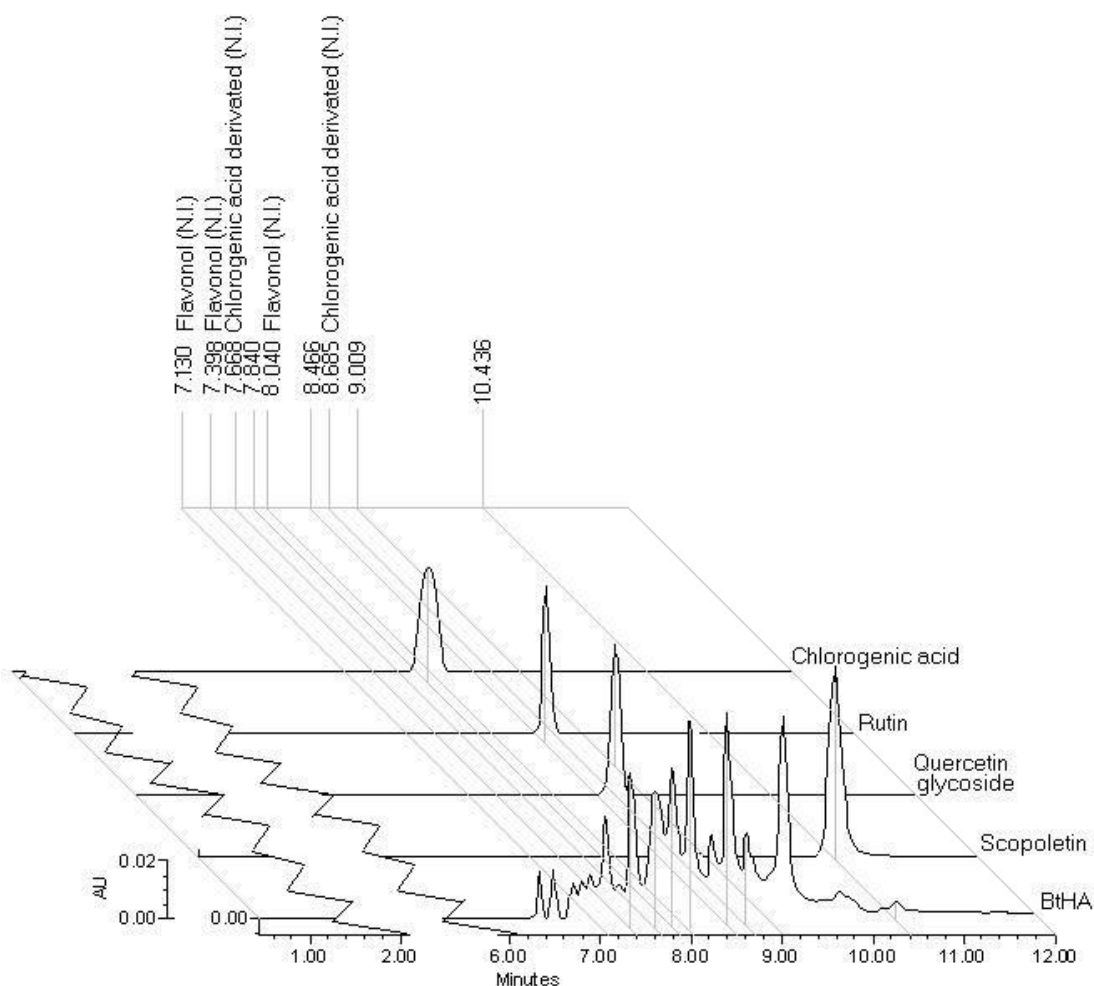


Figure 1.

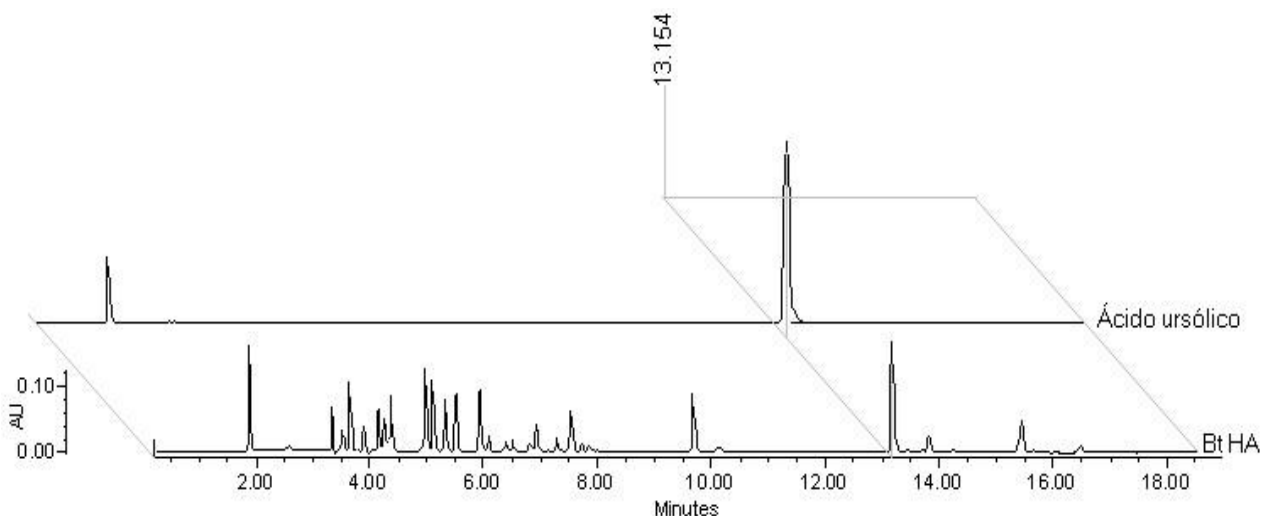


Figure 2.

Table 1 shows the quantitative analysis of quercetin glycoside, rutin, ursolic acid, scopoletin and chlorogenic acid detected in BtHA extract as well as their retention times (R_T) and Initial, maximum and final wavelength (λ).

3.2 BtHA effect on the forced swimming test (FST)

Figure 3 shows the negative control group that corresponds to the animals that were treated only with VEH, this group presented an immobility time of 261 s. Whereas the group of animals that received the administration of the antidepressant IMI, showed a decrease in this parameter down to 75 s, which was significantly different ($* p < 0.05$) to VEH. Furthermore, the administration of doses 50, 100 and 200 mg/kg of BtHA produced on the experimental animals, a similar behaviour ($p > 0.05$) to the VEH group, with immobility times of 255, 243 and 240 s respectively. However, the administration of 500 mg/kg caused a significant decrease in the immobility time of mice in this group ($p < 0.05$), with an average value of 150 s.

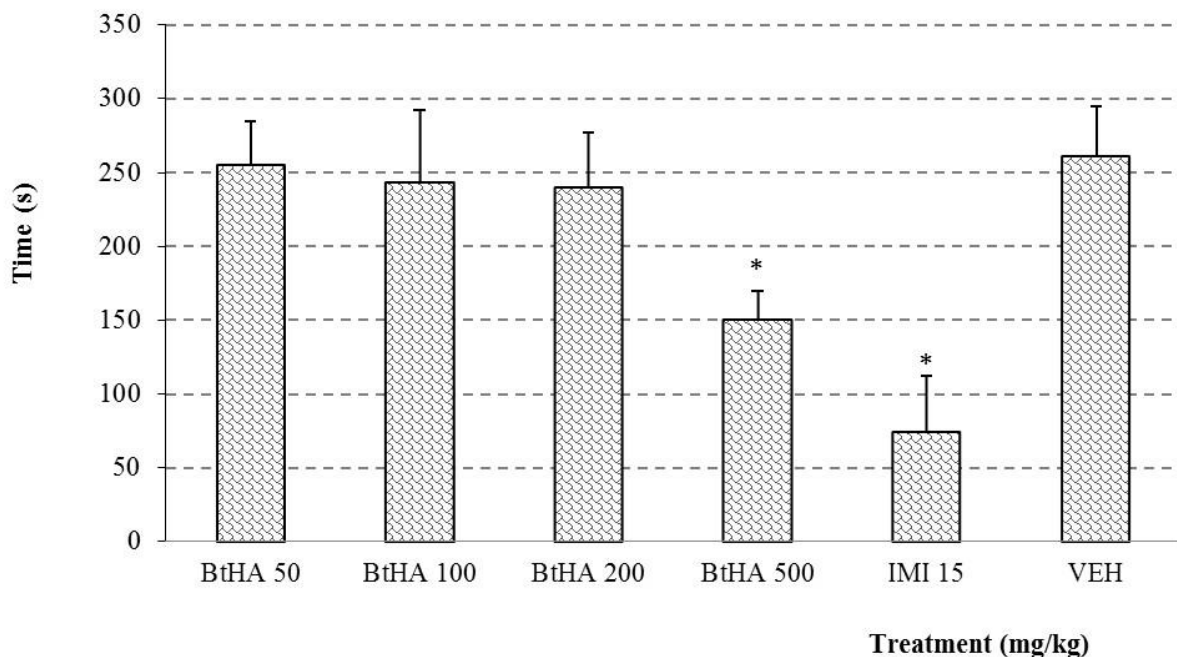


Figure 3.

3.3 Effect of BtHA on the elevated plus-maze test (EPM)

In the elevated plus-maze test, the negative control group, which received only VEH, showed a percentage of POA of 23%, while TOA was 19%. The animals receiving the anxiolytic treatment of DZP (1.0 mg/kg) had a statistically significant increase compared to VEH group in both parameters

($p < 0.05$), with a POA and TOA of 73%. A similar effect was observed with acute administration of BtHA starting at the lowest dose of 100 mg/kg (POA = 53% and TOA = 57%), 200 mg/kg (POA = 53% and TOA = 67%) and finally 500 mg/kg (POA = 51% and TOA = 66%), this activity was statistically different to the VEH group and no dose-dependence was observed (Figure 4).

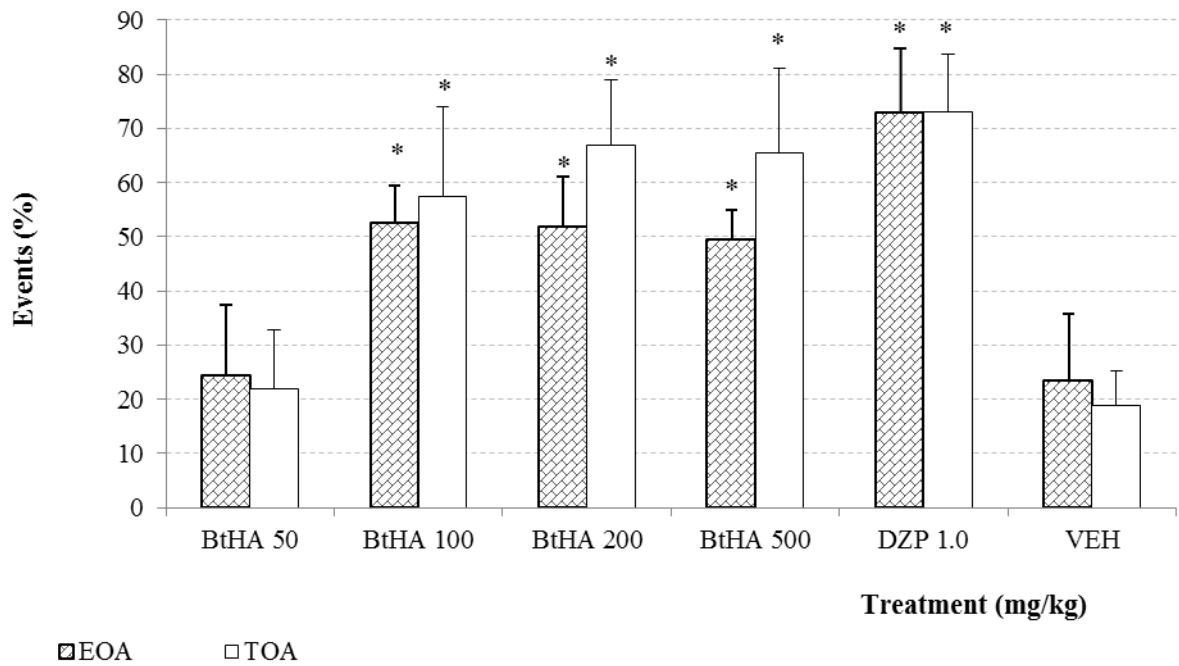


Figure 4.

3.4. Effect of BtHA on open field test (OFT)

In the open field test the treatments with DZP, BtHA and the negative control group did not showed statistically differences in their behaviour ($p > 0.05$, Figure 5).

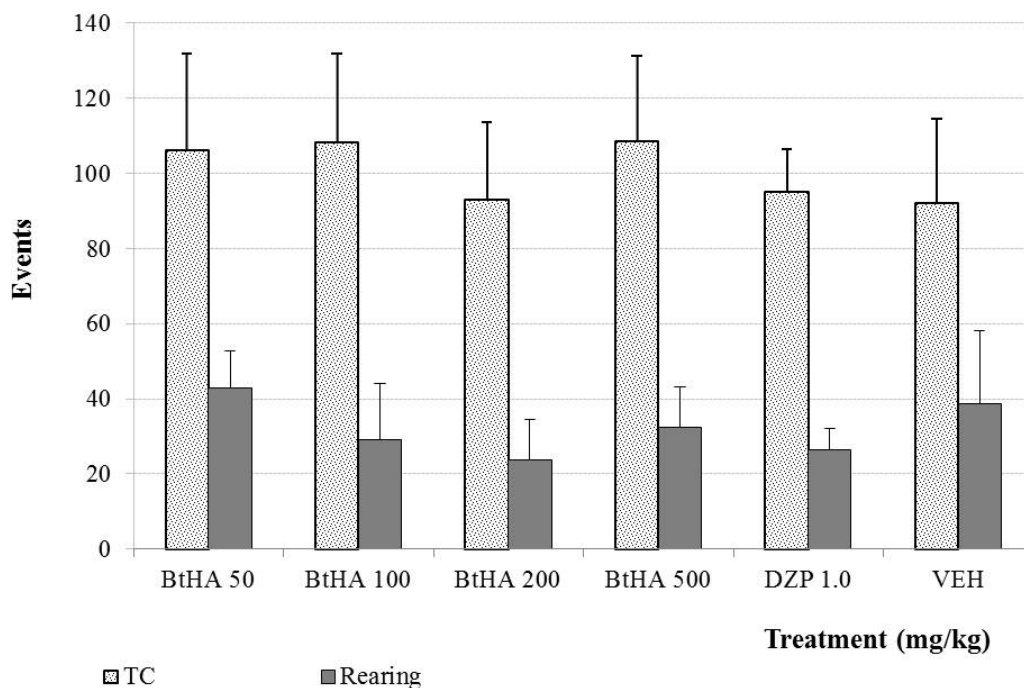


Figure 5.

3.5. Effect of BtHA on the passive avoidance task (PAT).

During the training phase (Tra, day 1), the average time that took the animals to cross from the light compartment to the dark one was 22 s (Figure 6). In the acquisition phase (Acq, day 2), the time it took to cross over to the dark side was significantly increased up to 450 s.

On the test day, the group of animals that received ESC + VEH (2.0 mg/kg *ip*), had a retention latency of 30 s, which was significantly lower ($*p < 0.05$) compared to the basal group 422 s (treated only with VEH). The effect of ESC was blocked by administration of GAL (4.0 mg/kg), which induced a statistically significant increase up to 415 s in respect to the ESC + VEH ($*p < 0.05$) in the retention time parameter, although statistically equal to the Basal group ($p > 0.05$).

The groups of mice that received for 4 days the doses of 100, 200 and 500 mg/kg of BtHA, showed a blockage of the ESC effect on the retention latency that was increased due to a dose dependent effect. Reaching values of 200, 341 and 464 s respectively, these results were significantly different from the group with induced damage by the administration of ESC + VEH ($*p < 0.05$). The lowest dose of BtHA (50 mg/kg) did not induce changes from those of ESC + VEH group ($p > 0.05$).

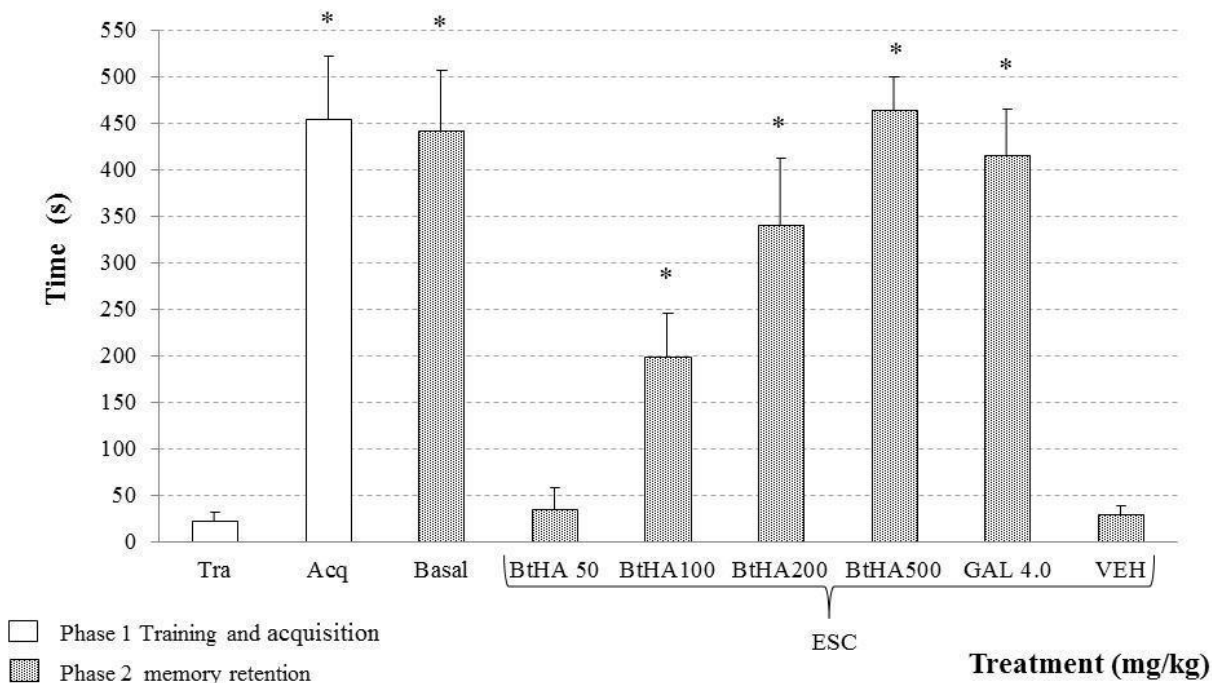


Figure 6.

4. Discussion

B. ternifolia is a medicinal species belonging to the Rubiaceae family, to which it has numerous properties, including its ability to treat headaches and nervous disorders. This plant is usually prepared as an infusion of its leaves, flowers and stems. It has been described that this plant has an antagonistic capacity on the secretagogue effect on scorpion's venom *Centruroides limpidus limpidus*, as well as, an anti-toxic capacity (Jiménez-Ferrer, 2005a; Jiménez-Ferrer, 2005b).

In this paper is presented the nootropic, anxiolytic and antidepressant effects of BtHA extract, under a scheme of dose-response curves. In this regard, there is a previous study by our working group, where it shows that the hydroalcoholic extract and some fractions of different chemical composition are capable of inhibiting the activity of the acetylcholinesterase enzyme in an *in vitro* model (Herrera-Ruiz *et al.*, 2012). Drugs that have a similar mechanism of action, are used in the clinic to treat patients with senile dementia or Alzheimer's disease, due to the capacity of blocking this enzyme experimentally as well as clinically, where it reduces or slows down the cognitive impairment (Perry *et al.*, 2003). Examples of substances of natural origin that are used as nootropics and that have this mode of action are: galantamine, an isolated secondary metabolite obtained from *Galanthus woronowii*, physostigmine from *physostigma venenosum* and huperzine A from *Lycopodium serratum*. Therefore the ability to inhibit the enzyme acetylcholinesterase by BtHA, help to understand the dose-dependent nootropic effect of this extract, on the model of cognitive impairment induced by scopolamine, on the passive avoidance task. This effect may be the result of increased availability of

acetylcholine (ACh) in the synaptic spaces, caused by the inhibition of acetylcholinesterase, due to BtHA. In this regard, it has been shown that scopolamine exerts a temporal effect on memory, by antagonizing the neurotransmitter ACh on its muscarinic receptors; the increased availability of ACh (by inhibiting the enzyme that degrades it with BtHA), reverses the toxic effect of ESC throughout the displacement of the receptor site, as there is an increase in the competition between the agonist and the antagonist (Goodman & Gillman, 2004). This may explain why the dose of 50 mg/kg of BtHA did not caused a nootropic effect, whereas the increase of BtHA dosages (100, 200 and 500 mg/kg) induced a higher memory effect depending on the dose. Which is consistent with that reported for the *in vitro* study, in which BtHA inhibited the enzyme in a concentration-dependent phase (Herrera-Ruiz et al., 2012), therefore the oral administration of increasing doses of hydroalcoholic extract induced a greater inhibition of the acetylcholinesterase enzyme and therefore higher concentration of available ACh, action which reflects on the memory process of the mice subjected to the PAT assay.

Due to the CNS effect that has been attributed to *B. ternifolia* (Argueta, 1994), the anxiolytic activity of the BtHA extract was measured on the elevated plus-maze model (EPM); this assay is for many authors the most common one to measure anxiety. It is based on, the natural tendency that rodents explore new environments while avoiding dangerous spaces like unprotected, bright or high spaces (represented by the open arms of the maze). It has been proven that placing animals in under these conditions causes an increase in corticosterone levels in serum and in defecation, which validates the behavioural and physiological response to the model. In addition, it is administered an anti-anxiety drug such as benzodiazepines, increasing the exploration of the open arms, attributing to this model a pharmacological validation (Pellow et al., 1986; File et al., 1990). The anxiolytic effect of BtHA was observed from the doses of 100 up to 500 mg/kg, were there was a significant increase in the parameters of POA% and TOA%. Furthermore, BtHA was evaluated at the same dosages in the forced swimming test (FST), which is an experimental strategy, which is widely used in finding treatments for depression. This test is based on observing the immobility of the animals that reflects some of the aspects of depression, such as hopelessness, which can be diminished with the administration of classical antidepressants used clinically (David et al., 2003). In the present study it was observed, that the highest dose administered (500 mg/kg) of BtHA is capable of decreasing the immobility time of mice that were put in to the cylinder with water, compared to the lower doses that did not have an influence on this parameter.

Apparently, the effect that *B. ternifolia* has on the CNS is greater on the anxiety behaviour than on depression, however, not either one of the models presents a dose dependent activity, while it happens with the nootropic effect of this study. Also, it was observed that none of the dosages used significantly modified the spontaneous motor activity measured in the open field test, in which it is considered that an increase in locomotion of the mice in response to a treatment is related to a stimulating effect, while a decrease in said parameter is taken as a sedative effect (Prut et al., 2003). On the other hand, in trials of FST is considered necessary to confirm that the antidepressant effect is

not masked with an increase in motor behaviour of the animals, so this activity should be confirmed with a spontaneous motor activity tests (Petit-Demouliere et al., 2005) like in the open field test.

These rather different activities are probably due to the concentration of secondary metabolites in the extract. In the current work the presence of some phenolic compounds were observed like, rutin, quercetin glycoside and chlorogenic acid; coumarins, scopoletin and the terpene ursolic acid.

The nootropic effect of *B. ternifolia* may well be associated with the presence of these compounds, for example it has been shown that the terpene ursolic acid isolated from *Salvia chrysophylla* Stapf and *Nepeta sorgerae*, selectively inhibits the enzyme acetylcholinesterase (Yilmaz et al., 2012; Culhaoglu et al., 2013). In a model of cognitive impairment induced through obesity it showed that the administration of ursolic acid significantly improves behavioural performance associated with memory deficit of mice. In a different study, it is shown that a daily oral administration for 2 weeks of 10 mg/kg of ursolic acid, exerts a protective effect against neurotoxicity induced by d-galactose, reversing the deterioration in learning and memory in mice, evaluated on the Morris water maze (Lu et al., 2007). It is thought that ursolic acid can be related to the inhibition of the signal mediated by nuclear factor kappa B (NF- κ B), an inflammatory mechanism, also evaluated on the Morris water maze (Lu et al., 2011).

The flavonoid, rutin already described above in the *B. ternifolia* description, is also found in other important medicinal plants. It has been isolated from different genus of Scorzonera. Rutin has been described to have a slight anti-acetylcholinesterase activity (Senol et al., 2014), which could mean the participation of routine as a memory enhancer. But apparently this flavonoid exerts its nootropic effect through different pathways, due to the attributed effects on the cognitive process when male Wistar rats were administration *ip* with doses of 5 and 10 mg/kg for a week observing an increase in the latency of learning and memory retention in the passive avoidance task (PAT). Rutin administered for three weeks at a dose of 100 mg/kg, promotes recovery of the memory of the rats receiving the β -amyloid peptide (β A), it is suggested that, this effect is achieved thru stimulating the protein kinase enzyme route activated throughout mitogen (MAPK) (Nassiri-Asl et al., 2014; Moghbelinejad et al., 2014). In another study, it is suggested that the rutin doses of 20, 40 and 80 mg/kg administered orally, have a protective effect against cognitive deficit in rats with traumatic brain injury and that were exposed to the Morris water maze, the authors propose that this effect is by modulating nitric oxide release (Kumar et al., 2014).

It has been demonstrated that chlorogenic acid, also present in BtHA, has a protective effect on rats with streptozotocin-induced diabetes, such that the dose of 5 mg/kg causes improvement of memory

and prevents the increase of the activity of acetylcholinesterase enzyme found in the cerebral cortex of the animals (Stefanello et al., 2014).

Scopoletin, which concentration in the BtHA extract was of 3.23 mg/g, it is a metabolite that was isolated from *Scopolia carniolica* Jaqc. Scopoletin has been identified as an acetylcholinesterase enzyme inhibitor using an *in vitro* assay with Ellman's reagent. Rolliger showed that the intracerebroventricular (ICV) administration of coumarin 2 μ M causes an increase in the extracellular concentration of brain acetylcholine (Rolinger et al., 2004). Important results from a study indicate that scopoletin is capable of modulating several mechanisms associated with cognitive deficits. Due to the increment on long-term potentiation phenomenon (LTP), in sliced rat hippocampus, since it is a fundamental mechanism of learning and memory consolidation; which acts through a mechanism dependent of the modulation of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Also in this study the authors suggest that ICV administration of scopoletin improves memory of mice that have cholinergic deficit and are evaluated in the T-shaped maze (Hornick et al., 2011).

There are reports that show that polar extracts like BtHA, have memory enhancing properties, such as the case of *Ilex paraguariensis* St. Hilaire that administered *ip* at 250 mg/kg improves social memory in mice. This extract contains caffeine, rutin and kaempferol in its composition (Prediger et al., 2008).

Besides the nootropic effect, BtHA has anxiolytic and antidepressant activity, although there are no reports of such activities for this medicinal species, there are data in the literature showing that polar extracts of plants in the Rubiaceae family, induce these pharmacological responses. As *Nauclea latifolia* administered to mice, is able to increase the percentage of crossings to open arms (Ngo et al., 2009). Of the compounds contained in BtHA, scopoletin already has antidepressant activity reports, doses of 10-100 mg/kg administered orally, reduced the immobility time in the model of tail suspension, and at 1-100 mg/kg administered orally has an effect on forced swimming test, without modifying the spontaneous motor activity of mice. In this same study, pre-treatment with scopoletin 10 mg/kg, was blocked by *ip* administration of antagonists systems serotonergic neurotransmission (ketanserin, antagonist of 5-HT_{2A} receptors), noradrenergic (prazosin, α -1 adrenoreceptors, yohimbine, α -2 adrenoceptor) and dopaminergic (haloperidol, SCH23390 or sulpiride; antagonists D1 and D2 receptors) (Capra et al., 2010).

It has been reported that polar extracts of medicinal plant species, which have been shown to have anxiolytic and / or antidepressant activity, they possess compounds as routine and chlorogenic acid, such is the case of the hydroalcoholic extract of *Lactuca sativa*, that at doses of 200 and 400 mg/kg administered orally for 15 days, exerts an anxiolytic effect in the EPM (Harsha et al., 2013.); or *Biebersteinia multifida* DC which anxiolytic fraction contains scopoletin (Monsef-Esfahani et al., 2013). Also, the methanol extract of flowers from *Abelmoschus manihot* (AMEE) has an antidepressant effect on rats during forced swimming test, in the brain of these animals some flavonoids including quercetin, isoquercetin and glucoside quercetin (quercetin glycoside 3'-O) were detected in a liquid chromatography coupled to mass spectrometry (Guo et al., 2011). This work shows that *B. ternifolia* has nootropic, anxiolytic and antidepressant effects, without affecting the spontaneous motility of mice. Which is consistent with the empirical effects attributed in some parts of Mexico, on the other

hand phenolic compounds, coumarins and terpenes reported here, are suggested to be the responsible ones in part for at least the activities observed for this medicinal species. It is necessary to continue with the pharmacologic and chemical study of this plant, that allows us to get closer to a less complex chemically active fraction, characterized in its chemical content and try to investigate the mode of action by which it exerts its various biological effects on the CNS.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This paper is taken in part from the Ph.D. of Giovanni García Morales (Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud) belonging to the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), with a Doctoral fellowship from CONACyT, México (Registry no. 208601/202091). CONACyT support (212779) and IMSS support (99185086)

References

- Argueta, A. Cano, L. Rodarte, M., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México., pp: 1362-1363. ISBN: 968-29-7323-6.
- Capra, J.C. Cunha, M.P. Machado, D.G. Zomkowski, A.D. Mendes, B.G. Santos, A.R. Pizzolatti, M.G. Rodrigues, A.L., 2010. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *Eur J Pharmacol.*, 643(2-3):232-238 doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.043; PMID:20599906
- CONABIO., 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.
- Crews, L. Mashlia, E., 2010. Molecular Mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*; 19(R1): R12-R20. doi: 10.1093/hmg/ddq160; PMCID: PMC2875049.

- Çulhaoğlu, B. Yapar, G. Dirmenci, T. Topçu, G., 2013. Bioactive constituents of *Salvia chrysophylla* Stapf. *Nat Prod Res.*, 27 (4-5): 438-447. doi: 10.1080/14786419.2012.734820; PMID: 23126495.
- Darryl, P. MD. FACP., 2005. Treatments for Alzheimer Disease. *South Med J.*; 98(6):628-635. ISSN: 0038-4348.
- David, D.J. Renard, C.E. Jolliet, P. Hascoët, M. Bourin, M., 2003. Antidepressantlike effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)*, 166(4): 373-382. 10.1007/s00213-002-1335-4; PMID: 12601501.
- El Melik, R. Dubil A. Pound M. W., 2014. Duration of therapy with acetylcholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease as reported in the literature. *Consult Pharm.*, 29(6): 400-407. doi: 10.4140/TCP.n.2014.400.; PMID: 25202893
- File, S.E. Mabbutt, P.S. Hitchcott, P.K., 1990. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plusmaze. *Psychopharmacology (Berl.)*, 102 (1): 98-101. PMID: 1975449
- García-Morales, G., 2010. Efecto Inhibidor de acetilcolinesterasa por extractos de *Bouvardia ternifolia* cultivada en hidroponía. Tesis de Maestría, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional.
- Gonzales, M. R., 2005. Enfermedad de Alzheimer clínica, tratamiento y rehabilitación. 1ª Edn. Barcelona España. Masson; pp: 103. ISBN 84-458-0858-3.
- Goodman & Gilman, A., 2003. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10 Edn., McGraw-Hill. ISBN 970-10-3879-7.
- Guo, J. Xue, C. Duan, J.A. Qian, D. Tang, Y. You, Y., 2011. Anticonvulsant, Antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components in vivo. *Phytomedicine.*, 18(14):1250-1254. doi: 10.1016/j.phymed.2011.06.012; PMID:21784623
- Harsha, S.N. Anilakumar, K.R., 2013. Anxiolytic property of *Lactuca sativa*, effect on anxiety behaviour induced by novel food and height. *Asian Pac J Trop Med.*, 6

(7):532-536. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60091-7.; PMID: 23768824.

- Herrera-Ruiz, M. Zamilpa, A. González-Cortazar, M. Reyes-Chilpa, R. León, E. García MP, Tortoriello J, Huerta-Reyes M., 2011. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine.*,18(14):1255-1261. doi: 10.1016/j.phymed.2011.06.018; PMID:21788126.
- Hornick, A.L. Lieb, A. Vo, N.P. Rollinger, J.M. Stuppner, H. Prast, H., 2011. The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal long-term potentiation and ameliorates anticholinergic- and age-impaired memory. *Neuroscience.*, 197:280-292. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.09.006; PMID: 21945033.
- Jiménez-Ferrer E. Reynosa-Zapata I, Pérez-Torres Y. Tortoriello J., 2005. The secretagogue effect of the poison from *Centruroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and the antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia* extract. *Phytomedicine.*,12: 65-71. PMID:15693710
- Jiménez-Ferrer JE, Pérez-Terán YY, Román-Ramos R, Tortoriello J., 2005. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine.*;12 (1-2): 116-122. PMID:15693718
- Kumar, A. Rinwa, P. Dhar, H., 2014. Possible nitric oxide modulation in the protective effects of rutin against experimental head trauma-induced cognitive deficits: behavioral, biochemical, and molecular correlates. *J Surg Res.*, 188(1): 268-279. doi: 10.1016/j.jss.2013.12.028; PMID: 24484907.
- Lu, J. Wu, D.M. Zheng, Y.L. Hu, B. Cheng, W. Zhang, Z.F. Shan, Q., 2011. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav Immun.*, 25(8):1658-1667. doi: 10.1016/j.bbi.2011.06.009; PMID: 21708244.
- Lu, J. Zheng, Y.L. Wu, D.M. Luo, L. Sun, D.X. Shan, Q., 2007. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced

by D-galactose. *Biochem Pharmacol.*, 74(7): 1078-1090. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.007; PMID: 17692828.

- Moghbelinejad, S. Nassiri-Asl, M. Farivar, T. N. Abbasi, E. Sheikhi, M. Taguiloo, M. Farsad, F. Samimi, A. Hajiali, F., 2014. Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats. *Toxicol Lett.*, 224(1): 108-113. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.10.010.; PMID: 24148604
- Monsef-Esfahani, H.R. Amini, M. Goodarzi, N. Saiedmohammadi, F. Hajiaghaee, R. Faramarzi, M.A. Tofighi, Z. Ghahremani, M.H., 2013. Coumarin compounds of *Biebersteinia multifida* roots show potential anxiolytic effects in mice. *Daru.*, 21(1): 51. doi: 10.1186/2008-2231-21-51; PMID: 23803166.
- Nassiri-Asl, M. Zamansoltani, F. Javadi, A. Ganjvar, M., 2014. The effects of rutin on a passive avoidance test in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.*, 34(1): 204–207. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.11.006; PMID:19914327
- Ngo, B. E. Taiwe, G.S. Moto, F.C. Ngoupaye, G.T. Nkantchoua, G.C. Pelanken, M.M. Rakotonirina, V. Rakotonirina, A., 2009. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice. *Epilepsy Behav.*, 15(4): 434440. doi: 10.1016/j.yebeh.2009.05.014; PMID: 19560975.
- Organización Mundial de la Salud., 2004. *Invertir en Salud Mental*. Organización Mundial de la Salud. Ginebra Suiza, ISBN:92 4 356257 6.
- Pellow, S. File, S.E. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, 24:525-529. doi:10.1016/0091-3057(86)90552-6; PMID: 2871560
- Perry, N. S. Bollen, C. Perry, E. K. C. Ballard., 2003. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.*, 75 (1-2): 651-659. doi:10.1016/S0091-3057(03)00108-4; PMID: 12895683.
- Petit-Demouliere, B. Chenu, F. Bourin, M., 2005. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl.)*, 177 (3): 245-255. 10.1007/s00213-004-2048-7; PMID: 15609067.

- Prediger, R.D. Fernandes, M.S. Rial, D. Wopereis, S. Pereira, V.S. Bosse, T.S. Da Silva, C.B. Carradore, R.S. Machado, M.S. Cechinel-Filho, V. Costa-Campos, L., 2008. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol.*, 120(3): 465-473. doi: 10.1016/j.jep.2008.09.018; PMID: 18948179.
- Prut, L. Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology.*, 463 (1-3): 3–33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X; PMID: 12600700.
- Rollinger, J.M. Hornick, A. Langer, T. Stuppner, H. Prast, H., 2004. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J Med Chem.*, 47(25): 6248-6254. DOI: 10.1021/jm049655r; PMID: 15566295.
- Senol, F.S. Acikara, O.B. Citoglu, G.S. Orhan, I.E. Dall', A.S. Ozgökce, F., 2014. Prospective neurobiological effects of the aerial and root extracts and some pure compounds of randomly selected *Scorzonera* species. *Pharm Biol.*, 52(7): 873-882. doi: 10.3109/13880209.2013.872152; PMID: 24920233.
- Stefanello, N. Schmatz, R. Pereira, L.B. Rubin, M.A. da Rocha, J.B. Facco, G. Pereira, M.E. Mazzanti, C.M. Passamonti, S. Rodrigues, M.V. Carvalho, F.B. da Rosa, M.M. Gutierrez, J.M. Cardoso, A.M. Morsch, V.M. Schetinger, M.R., 2014. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Mol Cell Biochem.*, 388(1-2): 277-286. doi: 10.1007/s11010-013-1919-9; PMID: 24370728.
- Yilmaz, A. Çağlar, P. Dirmenci, T. Gören, N. Topçu, G., 2012. A novel isopimarane diterpenoid with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Nepeta sorgerae*, an endemic species to the Nemrut Mountain. *Nat Prod Commun.*, 7(6):693-696. PMID: 22816286.

Figure 1. HPLC Chromatographic analysis of BtHA extract read at λ 350 nm.

Figure 2. HPLC Chromatographic analysis of BtHA extract read at λ 210 nm.

Figure 3. Effects of the treatments with IMI, VEH and different doses of BtHA on the immobility time of mice tested on FST. With ANOVA followed by Dunnet's post-test average \pm SD (n = 7).

Figure 4. Effects of treatments with IMI, VEH and different doses of BtHA on the percentage of POA and TOA of the EPM test. With ANOVA followed by Dunnet's post-test average \pm SD (n = 7).

Figure 5. Effect of administration of different doses of BtHA on total passes and vertical uprisings (rearing) on OFT. DZP = diazepam; VEH = negative control. With ANOVA followed by Dunnet's post-test average \pm SD (n = 7).

Figure 6. Effect of the administration of different dosages of BtHA, on the parameter of memory retention on mice with scopolamine induced damage during the passive avoidance test. GAL = Galantamine; VEH = negative control; Tra = day of training; Acq = Acquisition Day Two; Ret = retention at the end of the trial. With ANOVA followed by Dunnet's post-test average \pm SD (n = 7).

Table 1. BtHA extract concentration of quercetin glycoside, scopoletin, chlorogenic acid and ursolic acid.

COMPOUNDS	R _T (min)	CONCENTRATION (mg/g of extract)	λ (nm)		
			A	B	C
Flavonols					
Quercetin glycoside	9.01	9.73	254	350	453
Rutin	8.46	NI	205	255	355
Flavonol	8.03	NI	255	355	448
Flavonol	7.39	NI	254	354	442
Flavonol	7.12	NI	212	267	300
Terpene					
Ursolic acid	13.15	15.73	190	205	266
Coumarin					
Scopoletin	10.43	3.23	297	350	420
Fenylpropanoids					
Chlorogenic acid	7.66	0.16 NI	243	327	416
Chlorogenic acid derivative	7.81	NI	245	330	419
Chlorogenic acid derivative	8.68		200	227	267

NI= not identified; R_T= retention time; λ=wavelength; A=initial; B=maximum; C= final.