



Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud

“Evaluación del efecto neuroprotector e inmunomodulador de *Tagetes lucida* en el modelo murino de desmielinización inducido por cuprizona”

T E S I S

Que para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

PRESENTA:

Gabriela Castro Martínez

Matricula: 2202800915

ORCID: 0009-0001-0508-486X

Correo electrónico: gcm_19@hotmail.com

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Julio César Almanza Pérez (Codirector interno)

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer (Codirector externo)

JURADO

Presidente: Dr. Julio César Almanza Pérez

Secretario: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Vocal: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Vocal: Dra. Mayra Alejandra Santillán Urquiza

Vocal: Dra. Elian Yuritzi Alegría Herrera

Iztapalapa, Ciudad de México a 10 de diciembre del 2024

ADSCRIPCIONES DEL COMITÉ TUTORAL

Codirector interno: Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Adscripción: Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1era Secc, Ciudad de México 09310, México.

Codirector externo: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Adscripción: Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano Del Seguro Social, Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, México.

Asesora: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Adscripción: Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano Del Seguro Social, Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, México.



El autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 773893, que comprendió del periodo del 1 de septiembre del 2020 hasta el 31 de agosto del 2024. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCyT, con número de referencia 001480.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de farmacología y fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer y asesorado por la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz y el Dr. Manases González Cortázar. El trabajo fue aprobado por el comité de Investigación en salud local del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro: R-2020-1702-073.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó: **Gabriela Castro Martínez** el día 10 de diciembre del 2024.

JURADO

Dr. Julio César Almanza Pérez
Presidente

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Secretario

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz
Vocal 1

Dra. Mayra Alejandra Santillán Urquiza
Vocal 2

Dra. Elian Yuritzi Alegría Herrera
Vocal 3

DEDICATORIA

A DIOS

*A mi hija, **Sofía Gabriela Castro Martínez:***

Con profundo amor y orgullo, te dedico esta tesis. A lo largo de este viaje académico, tu presencia ha sido una fuente constante de inspiración y motivación para mí. Has sido mi fuerza en los momentos difíciles y mi alegría en cada pequeño logro.

Tu curiosidad, determinación y amor por el aprendizaje me han recordado constantemente la importancia de perseverar y seguir adelante, sin importar los obstáculos. Este trabajo es un reflejo de ese espíritu que veo en ti cada día.

Gracias por tu paciencia y comprensión durante los momentos en que mi atención estuvo dividida entre este proyecto y nuestras vidas diarias. Tu apoyo incondicional ha sido fundamental para alcanzar esta meta.

Espero que esta tesis no solo sea un testimonio de mi esfuerzo, sino también una motivación para ti. Que siempre persigas tus sueños con la misma pasión y dedicación, y que recuerdes que los logros son posibles con esfuerzo y perseverancia.

Te amo más de lo que las palabras pueden expresar y estoy infinitamente agradecida por tenerte en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer y a la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz:

Gracias por brindarme todo su apoyo durante mi estancia en el CIBIS y por asesorarme en el desarrollo de este trabajo. Siempre estaré muy agradecida por tener la oportunidad de conocerlos y espero seguir colaborando con ustedes.

Al Dr. Julio César Almanza Pérez:

Gracias por aceptarme como alumna y por el constante apoyo académico. Aprecio mucho conocerlo y espero seguir colaborando con usted.

Al Dr. Manases González Cortázar:

Gracias por ser una parte fundamental en el desarrollo de este proyecto.

A los colaboradores del CIBIS-IMSS y de la UAM-I:

Gracias por su colaboración y apoyo.

A mi querida madre:

Gracias por tu inmenso amor y dedicación al cuidar de mi hija cuando lo necesitaba. Tu apoyo ha sido fundamental para que yo pudiera concluir esta tesis. No podría haberlo logrado sin tu ayuda incondicional.

A mi querido Ángel Cruz:

Gracias por tu amor, paciencia y apoyo incondicional durante este viaje. Tu confianza en mí y tu ánimo constante me han ayudado a superar cada obstáculo.

Con todo mi cariño y gratitud,

Gaby Castro



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 10 de diciembre del año 2024, quien suscribe **Gabriela Castro Martínez**, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada "**Evaluación del efecto neuroprotector e inmunomodulador de *Tagetes lucida* en el modelo murino de desmielinización inducido por cuprizona**", bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por: **El Dr. Julio César Almanza Pérez, el Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer y la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz**, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico gcm_19@hotmail.com; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

M. en M. M. Gabriela Castro Martínez
2202800915



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Allixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Declaración de originalidad

La que suscribe **Gabriela Castro Martínez**, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad **Iztapalapa**, y autora de la tesis titulada:

“Evaluación del efecto neuroprotector e inmunomodulador de *Tagetes lucida* en el modelo murino de desmielinización inducida por cuprizona”

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autorial y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 10 de diciembre del 2024.

Atentamente

M. en M. M. Gabriela Castro Martínez



UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 OLIGODENDROCITOS	2
2.1.1 <i>Mielina</i>	3
2.1.2 <i>Enfermedades desmielinizantes</i>	4
2.2 ESCLEROSIS MÚLTIPLE	4
2.2.1 <i>Epidemiología de la EM</i>	5
2.2.2 <i>Progresión de la EM</i>	6
2.2.3 <i>Fisiopatología de la EM</i>	7
2.2.4 <i>Neuroinflamación en la EM</i>	8
2.3 NEURODEGENERACIÓN EN LA EM	10
2.3.1 <i>Hipocampo</i>	11
2.3.2 <i>Impacto de las Enfermedades del SNC en el Hipocampo</i>	12
2.4 FÁRMACOS CONVENCIONALES	13
2.4.1 <i>Prednisona</i>	14
2.4.2 <i>Silimarina</i>	15
2.5 MODELOS MURINOS EXPERIMENTALES ÚTILES EN EL ESTUDIO DE LA EM	16
2.5.1 <i>Modelo murino de desmielinización inducido por CPZ</i>	17
2.6 <i>TAGETES LUCIDA CAV</i>	18
2.6.1 <i>Usos medicinales de T. lucida</i>	19
2.6.2 <i>Neurofarmacología de T. lucida</i>	20
3 JUSTIFICACION	24
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
5 HIPOTESIS	26
6 OBJETIVOS	27
6.1 OBJETIVO GENERAL	27
6.1.1 <i>Objetivos particulares</i>	27
7 MATERIAL Y METODOS	28
7.1 OBTENCIÓN DE LA PLANTA Y EXTRACTOS DE: HEXANO Y ACETATO DE ÉTILO	28
7.2 FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DE LOS TLHX Y TLACOET	29
7.2.1 <i>Agrupación de fracciones con similitud química del extracto TIHx</i>	30
7.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	30
7.4 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	31
7.5 ESTANDARIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS TLHX Y TLACOET	31
7.6 MODELOS EXPERIMENTALES	32
7.6.1 <i>Animales de experimentación</i>	32
7.6.2 <i>Modelo de daño motor inducido por la administración de CPZ: 1) en el alimento y 2) por administración forzada</i>	32
7.6.3 <i>Modelo de daño motor y neuroinflamación por administración forzada de CPZ</i>	33
7.7 PRUEBAS CONDUCTUALES	35
7.7.1 <i>Parámetros de Irwin</i>	35
7.7.2 <i>Prueba de Rr</i>	36
7.7.3 <i>Campo Abierto (CA)</i>	36
7.8 TINCIÓN POR AZUL DE EVANS	37

7.9 CUANTIFICACIÓN DE IL-1B, IL-4, IL-10 Y TNF-A EN CEREBRO POR ELISA.....	37
7.10 OBTENCIÓN Y FIJACIÓN DE ÓRGANOS PARA PRUEBAS HISTOLÓGICAS	38
7.10.1 <i>Obtención de cortes histológicos de cerebro</i>	38
7.10.2 <i>Tinción hematoxilina y eosina en hipocampo</i>	39
7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
8 RESULTADOS	42
8.1 PERFIL QUÍMICO DEL TLHX Y TLACOET.....	42
8.1.1 <i>Estandarización de los extractos TIHx y TIAcOEt</i>	42
8.2 EFECTO DE CPZ SOBRE PARÁMETROS CONDUCTUALES EN RATONES.....	44
8.2.1 <i>Prueba de Irwin</i>	44
8.2.2 <i>Efecto de CPZ sobre la motricidad y coordinación motora en ratones</i>	45
8.2.3 <i>Efecto de CPZ sobre la locomoción y otras conductas en CA</i>	47
8.3 EFECTO DE CPZ SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LA BHE	49
8.4 EFECTO DE DOS EXTRACTOS ESTANDARIZADOS Y CINCO CUMARINAS DE <i>T. LUCIDA</i> SOBRE EL DAÑO MOTOR INDUCIDO POR CPZ.....	51
8.4.1 <i>Parámetros de Irwin</i>	51
8.4.2 <i>Prueba de Rr</i>	53
8.4.3 <i>Prueba de CA</i>	54
8.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE <i>T. LUCIDA</i> SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LA BHE	55
8.6 EFECTO INMUNOMODULADOR DE <i>T. LUCIDA</i>	56
8.7 EFECTO DE <i>T. LUCIDA</i> SOBRE EL DAÑO A HIPOCAMPO POR TINCIÓN H&E	58
9 DISCUSIÓN.....	64
10 CONCLUSIONES	76
11 RESUMEN GRÁFICO	77
12 PERSPECTIVA.....	77
13 REFERENCIAS	78
14 ANEXOS	87
Anexo 1. Cromatogramas y espectros UV de: IC, HN, DF, SC y PE.....	87
Anexo 2. Artículo publicado.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desmielinización.....	3
Figura 2. Número de personas con EM.....	6
Figura 3. Mecanismo de desarrollo de la EM.....	10
Figura 4. Estructura del Hipocampo.....	12
Figura 5. Modelo de inducción por CPZ.....	17
Figura 6. Características de <i>Tagetes lucida</i>	19
Figura 7. Diagrama experimental del análisis químico de los extractos de <i>T. lucida</i>	28
Figura 8. Diagrama general de la fase experimental.....	35
Figura 9. Comparación de cromatogramas por CLAR.....	43
Figura 10. Tiempo de permanencia en la prueba de Rr.....	46
Figura 11. Efecto de la CPZ sobre la permeabilidad de la BHE.....	50
Figura 12. Efecto de <i>T. lucida</i> en la coordinación motora.....	53
Figura 13. Efecto de <i>T. lucida</i> en la prueba de CA.....	55
Figura 14. Efecto de <i>T. lucida</i> sobre la permeabilidad vascular en cerebro.....	56
Figura 15. Efecto de <i>T. lucida</i> sobre la inmunomodulación en cerebro.....	57
Figura 16. Histología de hipocampo.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos convencionales.....	14
Tabla 2. Taxonomía de <i>Tagetes lucida</i> Cav.....	19
Tabla 3. Sistema de separación de los extractos TIHx y TIAcOEt.....	29
Tabla 4. Sistema de separación CLAR.....	31
Tabla 5. Grupos experimentales de la comparación del modelo.....	33
Tabla 6. Grupos experimentales	34
Tabla 7. Parámetros de Irwin observados.....	36
Tabla 8. Concentración de cumarinas de <i>T. lucida</i>	43
Tabla 9. Comparación de los efectos de la CPZ por parámetros de Irwin	45
Tabla 10. CA de CPZ en 0.2% en alimento.....	48
Tabla 11. CA de CPZ por administración forzada.....	48
Tabla 12. Porcentaje de ratones con piloerección durante la prueba de Irwin.....	52
Tabla 13. Porcentaje de ratones amontonados durante la prueba de Irwin.....	52

ABREVIATURA

µg: Microgramos	IL1β: Interleucina uno beta
ABC: Área bajo la curva	IL4: Interleucina cuatro
AE: Azul de Evans	IL6: Interleucina seis
BHE: Barrera hematoencefálica	ILs: Interleucinas
CA: Campo Abierto	IMC: índice de masa corporal
CAm: Cuerno de amon	kg: kilogramos
CCA: Cromatografía en columna abierta	LFA-1: antígeno asociado a la función linfocitaria 1
CCF: Cromatografía en capa fina	EV: Elevamientos verticales
CLAE: Cromatografía líquida de alta eficacia	mg: miligramos
CM: Capa molecular	Min: minutos
CMHCII: complejo mayor de histocompatibilidad clase II	MMPs: Metaloproteinasas
CPO: Célula progenitora de oligodendrocitos	MOG: Glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
CPZ: Cuprizona	NO: Óxido nítrico
CT: Cruces totales	OLG: Oligodendrocito
DF: Dimetilfraxetina	PBM: Proteína básica de mielina
EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental	PDN: Prednisona
EE: Error estándar	PE: Prenilescopoletina
ELISA: ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas	PLP: Proteína proteolípida
EM: Esclerosis múltiple	PP: Primariamente progresiva
EO: Estrés oxidante	PR: Progresiva recurrente
ERO: Especies reactivas de oxígeno	RM: Resonancia magnética
EV: Elevamientos verticales	RR: Recurrente remitente
F: Fracción	S: Subículo
FIEM: Federación Internacional de la Esclerosis Múltiple	SC: Escoprona
FN: Fase normal	SLM: Silimarina
FR: Fase reversa	SNC: Sistema nervioso central
G: Células granulares	SNP: Sistema nervioso periférico
GC: Glucocorticoide	SNS: Sistema nervioso simpático
GD: Giro dentado	SP: Secundariamente progresiva
GSH: Glutatió	<i>T. lucida:</i> <i>Tagetes lucida</i>
H&E: Hematoxilina y eosina	TFA: Acido trifloroacetico
HN: Herniarina	TIACOEt: Extracto de acetato de etilo de <i>Tagetes lucida</i>
hr: hora	TIHx: Extracto de hexano de <i>Tagetes lucida</i>
IC: Isopreniloxicumarina	TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1	VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1
IFNγ: Interferón gamma	VEH: Vehículo
IL: Interleucina	
IL10: Interleucina diez	
IL-12: Interleucina doce	
IL-17: Interleucina diecisiete	

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por la degeneración axonal y la destrucción de la mielina. Diversos modelos biológicos, como la intoxicación por cuprizona en roedores, permiten simular las manifestaciones clínicas de la EM. Este modelo provoca la apoptosis de los oligodendrocitos, causando desmielinización en áreas específicas del SNC. El objetivo de este estudio fue establecer un modelo de daño inducido por cuprizona mediante administración forzada y comparar el comportamiento de los animales con aquellos que recibieron el tóxico a través del alimento. Utilizando ratones macho BALB/c, se administró cuprizona (CPZ) mediante ambos métodos durante períodos de tres, cuatro y cinco semanas. Se evaluaron los efectos sobre la conducta y la actividad motora mediante la prueba de Irwin, campo abierto y rota-rod, además de evaluar la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) al final de cada semana. Los resultados demostraron que ambos métodos de administración son efectivos para investigar el impacto en la función motora y el daño a la BHE. Sin embargo, la administración forzada mostró una mayor incidencia de daño motor, probablemente debido a la precisión en la dosificación de CPZ en cada animal, a diferencia de la variabilidad en la ingesta cuando se administra a través del alimento. Actualmente, la EM carece de un tratamiento curativo, y las terapias disponibles buscan modificar su curso. Se ha demostrado que los extractos de *Tagetes lucida* poseen efectos inmunomoduladores y neuroprotectores. Para evaluar estos efectos, se indujo daño motor y neuroinflamación en ratones mediante la administración forzada de CPZ (40 mg/kg) durante cinco semanas, utilizando extractos y cumarinas de *Tagetes lucida* (25 mg/kg) para mitigar estos efectos. Durante el experimento, se realizaron pruebas de comportamiento y se evaluó la integridad de la BHE mediante la prueba de extravasación con colorante azul de Evans. Además, se midieron las concentraciones cerebrales de IL-1 β , IL-4, IL-10 y TNF- α por ELISA y se evaluó el daño histológico en hipocampo. Los resultados indican que los extractos de *Tagetes lucida*, 7-O-Prenilescopoletina (PE) y escoporona (SC), exhibieron una notable capacidad para aliviar síntomas inducidos por CPZ como la piloerección y el amontonamiento en ratones. En términos de coordinación y motricidad, todos los tratamientos evaluados (silimarina prednisona, extracto de hexano (TIHx), extracto de acetato de etilo, (TIAcOEt) y las cinco cumarinas) mostraron mejoras significativas en la coordinación motora comparado con el grupo tratado con CPZ. También algunos tratamientos de *Tagetes lucida* mostraron ser efectivos en algunas variables de campo abierto, lo que sugiere un efecto neuroprotector que modula el daño motor. Además, se observó que la administración de CPZ provocó un incremento en la extravasación del colorante azul de Evans, en cerebro, en comparación con aquellos del grupo de animales sanos, lo que hizo evidente un aumento en la permeabilidad de la

BHE. Los fármacos usados como controles del ensayo, así como los tratamientos derivados de *Tagetes lucida* fueron capaces de disminuir el impacto negativo de CPZ sobre la vasculatura. Lo que indica un efecto protector sobre la BHE, un sitio crucial para la regulación del paso de sustancias al tejido cerebral. Por otro lado, los extractos de *Tagetes lucida* ayudaron a controlar la neuroinflamación al aumentar la expresión de IL-4 e IL-10 y reducir la IL-1 β y TNF- α . Los tratamientos con extractos de *Tagetes lucida*, particularmente TIAcOEt, dimetilfraxetina (DF), PE y SC, mostraron efectos neuroprotectores significativos, mejorando la organización celular y reduciendo la desmielinización e inflamación en el hipocampo. Aunque es necesario continuar con los estudios que permitan dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos farmacológicos aquí descritos, estos hallazgos resaltan el potencial terapéutico de *Tagetes lucida* en la protección del SNC frente a daños inducidos por CPZ.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS), characterized by axonal degeneration and myelin destruction. Various biological models, such as cuprizone intoxication in rodents, are used to simulate the clinical manifestations of MS. This model induces apoptosis of oligodendrocytes, leading to demyelination in specific areas of the CNS. The aim of this study was to establish a cuprizone-induced damage model through forced administration and compare the behavior of animals with those that received the toxin through food. Male BALB/c mice were administered cuprizone (CPZ) via both methods for periods of three, four, and five weeks. The effects on behavior and motor activity were assessed using the Irwin test, open field, and rota-rod tests, in addition to evaluating blood-brain barrier (BBB) integrity at the end of each week. The results demonstrated that both administration methods are effective for investigating the impact on motor function and BBB damage. However, forced administration showed a higher incidence of motor damage, likely due to the precision in CPZ dosing in each animal, compared to the variability in intake when administered through food. Currently, MS lacks curative treatment, and available therapies aim to modify its course. Extracts from *Tagetes lucida* have been shown to possess immunomodulatory and neuroprotective effects. To evaluate these effects, motor damage and neuroinflammation were induced in mice by forced administration of CPZ (40 mg/kg) for five weeks, using extracts and coumarins from *Tagetes lucida* (25 mg/kg) to mitigate these effects. During the experiment, behavioral tests were conducted, and BBB integrity was assessed using the Evans blue dye extravasation test. Additionally, brain concentrations of IL-1 β , IL-4, IL-10, and TNF- α were measured by ELISA, and histological damage in the hippocampus was evaluated. The results indicate that *Tagetes lucida* extracts, 7-O-Prenylescopoletin (PE), and scoparone (SC) exhibited a remarkable capacity to alleviate CPZ-induced symptoms such as piloerection and huddling in mice. In terms of coordination and motor skills, all evaluated treatments (silymarin, prednisone, hexane extract (TIHx), ethyl acetate extract (TIAcOEt), and the five coumarins) showed significant improvements in motor coordination compared to the CPZ-treated group. Some *Tagetes lucida* treatments were also effective in some open field test variables, suggesting a neuroprotective effect that modulates motor damage. Moreover, CPZ administration caused an increase in Evans blue dye extravasation in the brain, compared to healthy animals, indicating increased BBB permeability. The drugs used as controls in the assay, as well as *Tagetes lucida* derived treatments, were able to mitigate CPZ's negative impact on the vasculature, indicating a protective effect on the BBB, a crucial site for regulating the passage of substances into brain tissue. Furthermore, *Tagetes lucida* extracts helped control neuroinflammation by increasing IL-4 and IL-10 expression while reducing IL-1 β and TNF- α levels. Treatments with *Tagetes lucida* extracts,

particularly TIAcOEt, dimethylfraxetin (DF), PE, and SC, showed significant neuroprotective effects, improving cellular organization and reducing demyelination and inflammation in the hippocampus. Although further studies are needed to elucidate the molecular mechanisms underlying the pharmacological effects described here, these findings highlight the therapeutic potential of *Tagetes lucida* in protecting the CNS against CPZ-induced damage.

1 INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM), es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por inflamación y neurodegeneración asociada a la desmielinización de las neuronas (Baecher-allan *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2019). La etiología de la EM es desconocida, sin embargo, los datos epidemiológicos indican que tanto factores genéticos como ambientales: infecciones por virus (Epstein-Barr), el tabaco, la deficiencia de vitamina D, la latitud y un alto índice de masa corporal (IMC), podrían estar influyendo en el desarrollo y la progresión de este padecimiento (Baecher-allan *et al.*, 2018; Castillo-Álvarez & Marzo-Sola, 2017; LaMothe *et al.*, 2018). También, se han reportado otros de menor incidencia como el alto consumo de sodio, niveles elevados de leptina (hormona producida por el tejido graso), la vitamina A, el alcohol, la infección por helmintos *Helicobacter pylori*, alteraciones en la microbiota intestinal (Baecher-allan *et al.*, 2018; Castillo-Álvarez & Marzo-Sola, 2017). La EM, es una enfermedad neurológica, incapacitante, que no solo afecta a los adultos, hay por lo menos 30.000 personas menores de 18 años viviendo con dicho trastorno (Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES, s/f). El número estimado de personas con EM en todo el mundo ha aumentado a partir de la cifra de 2,3 millones de personas registrada en 2013 (LaMothe *et al.*, 2018; Macías-Cosme *et al.*, 2012; Terry *et al.*, 2016), a una cifra de 2.8 millones de personas en el mundo con esta enfermedad (Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES, s/f). La EM se desarrolla preferentemente en mujeres, con una relación mujer / hombre de 3:1 (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, *et al.*, 2011; Wootla *et al.*, 2012). Aunque la investigación sobre el desarrollo de la EM es amplia, el origen de esta patología aún permanece desconocido. Se ha observado que el inicio de la enfermedad está vinculado a la infiltración de células como las T autorreactivas y otras, que logran a travesar la barrera hematoencefálica (BHE), ocasionando daños significativos en el SNC (Slavin *et al.*, 1998; Wootla *et al.*, 2012). La EM es una enfermedad extremadamente compleja debido a la variedad de cuadros clínicos que puede presentar según la zona del SNC que se vea afectada (Baecher-allan *et al.*, 2018).

En la actualidad, no existe algún tratamiento curativo para esta enfermedad y las terapias disponibles están dirigidas a modificar la evolución de la enfermedad y a controlar sus síntomas, controlando los episodios de neuroinflamación (Anisha Doshi & Jeremy Chataway, 2017; LaMothe *et al.*, 2018). Por lo tanto, es necesario investigar nuevas alternativas terapéuticas que sean seguras y efectivas. Varias plantas que han sido instrumentos esenciales de la medicina tradicional en diferentes patologías están siendo utilizadas ahora como nuevas terapias. *Tagetes lucida* "pericón" es usada en la medicina

tradicional para tratar enfermedades gastrointestinales, urogenitales, dolor y trastornos neurológicos e inflamatorios (Capunzo *et al.*, 2003; González-Trujano *et al.*, 2019; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Estudios recientes han mostrado un gran interés en la investigación básica y la aplicación de *Tagetes lucida*, y varios autores han demostrado su actividad biológica en diferentes enfermedades. Los estudios farmacológicos sobre el uso de *Tagetes lucida* han indicado propiedades antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias, además de su potencial uso sobre enfermedades del SNC, siendo útil como: antinociceptivo, antidepresivo, ansiolítico, antipsicótico, neuroantinflamatorio y sedante (Bonilla-Jaime *et al.*, 2015; Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2006; Monterrosas-brisson *et al.*, 2020; Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Porras-Dávila *et al.*, 2022b; Santibáñez *et al.*, 2022, 2023).

Este estudio se diseñó para evaluar los efectos de dos extractos estandarizados, así como de las cumarinas derivadas de *Tagetes lucida*, en un modelo de desmielinización inducida químicamente mediante la administración de cuprizona en ratones BALB/c. Se evaluaron los déficits motores, la neuroinflamación y la permeabilidad de la BHE, además del daño específico al hipocampo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son células gliales (macrogliales) del SNC que se originan a partir de células progenitoras de oligodendrocitos (CPO), mediante procesos orquestados de migración, proliferación y diferenciación (Kuhn *et al.*, 2019). La función principal de los oligodendrocitos en el SNC es la producción de la mielina, un solo oligodendrocito puede mielinizar hasta 80 segmentos axónicos (Baumann & Pham-Dinh, 2001, Zirngibl *et al.*, 2022), mientras que en el sistema nervioso periférico (SNP) está constituida por células de Schwann (Nave, 2010). Las CPO sirven predominantemente como un grupo de respaldo para generar nuevos oligodendrocitos (Kuhn *et al.*, 2019; Leo & Kipp, 2022). Para formar las vainas de mielina, los oligodendrocitos necesitan un suministro elevado de energía para sintetizar cantidades suficientes de lípidos y proteínas (Zirngibl *et al.*, 2022). Los oligodendrocitos (OLG), son células muy susceptibles al estrés oxidante (EO) debido a su bajo contenido de antioxidantes como el glutatión (GSH) y alto nivel de hierro, el cual es necesario para la actividad enzimática. La interacción del hierro con el peróxido de hidrógeno, derivado de la dismutación del superóxido, puede generar radicales hidroxilo altamente reactivos a través de la reacción de Fenton (Kuhn *et al.*, 2019; Zirngibl *et al.*, 2022). Durante la mielinización, la producción de subproductos citotóxicos, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el peróxido de hidrógeno,

puede causar la muerte de los OLG (Kuhn *et al.*, 2019) y, consecuentemente enfermedades por desmielinización (Gorter & Baron, 2020; Kuhn *et al.*, 2019).

2.1.1 Mielina

La mielina, es una biomembrana compactada que forma una vaina con gran contenido de lípidos, que gira alrededor de los axones proporcionando aislamiento eléctrico en la propagación de los potenciales de acción (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Zhu *et al.*, 2021). En comparación con otras biomembranas, la mielina, tiene un contenido de lípidos de aproximadamente el 70% del peso seco y un contenido de proteínas relativamente bajo (30%), siendo la proteína proteolípida (PLP) y la proteína básica de mielina (PBM) las más abundantes (Leo & Kipp, 2022). Las vainas de mielina a lo largo de los axones son interrumpidas regularmente por los nódulos de Ranvier, en los cuales surge el potencial de acción, permitiendo la propagación del impulso nervioso de forma saltatoria, lo que ahorra energía al sistema y que es significativamente más rápida que la propagación del potencial de acción continua de las fibras no mielinizadas (Kuhn *et al.*, 2019; Leo & Kipp, 2022). Dado que la mielina aparece macroscópicamente blanca, las regiones altamente mielinizadas en el SNC también se denominan "materia blanca" en contraste con las áreas de "materia gris" menos mielinizadas (Kuhn *et al.*, 2019). La mielinización adecuada es crucial para varias funciones neurofisiológicas, mientras que la desmielinización puede causar enfermedad del SNC, como la EM (Figura 1); (Zhu *et al.*, 2021; Zirngibl *et al.*, 2022).

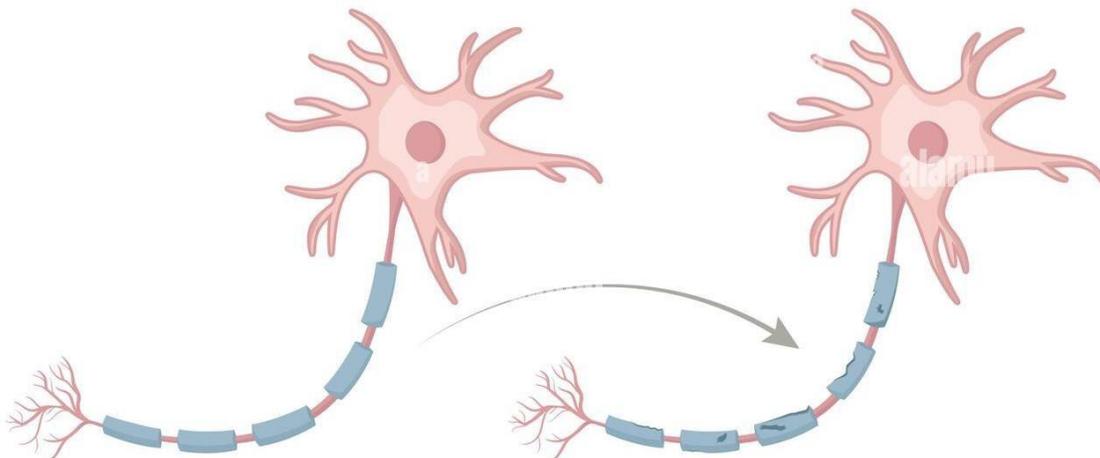


Figura 1. Desmielinización: La pérdida de mielina de los axones produce diversos síntomas según sean las funciones de las neuronas afectadas. Se interrumpe las señales entre el cerebro y otras partes del cuerpo, por lo que los síntomas difieren dependiendo de las zonas afectadas (Zhu *et al.*, 2021; Zirngibl *et al.*, 2022). Imagen tomada de: Stock Vector Image & Art - Alamy.

2.1.2 Enfermedades desmielinizantes

Existen varios trastornos del SNC que se caracterizan por la desmielinización o la destrucción de una vaina de mielina previamente intacta. La desmielinización se refiere a una vaina de mielina malformada y defectuosa, en contraposición a la destrucción de la mielina previamente normal que se observa en condiciones desmielinizantes (Leo & Kipp, 2022). Las enfermedades desmielinizantes constituyen un grupo de afecciones de etiología autoinmune dirigida contra la mielina (Savransky *et al.*, 2018). Cuando el sistema inmune, por algún motivo se activa adecuadamente, resulta beneficioso para el paciente. Sin embargo, en las enfermedades desmielinizantes, el sistema inmune se activa, desencadenado por infecciones previas, provocando la destrucción de la mielina (Wootla *et al.*, 2012). Algunos autores definen que cualquier enfermedad que afecta de forma preferente a la materia blanca (fibras nerviosas) del SNC puede incluirse entre las enfermedades desmielinizante como: leuco encefalomiелitis aguda hemorrágica, encefalomiелitis aguda diseminada, neuritis óptica, lesiones medulares como la miелitis aguda necrotizante, miелitis transversa, miелopatía crónica progresiva, miелopatía por radioterapia, miелopatía por HTLV-1, desmielinización monofásica aislada y la EM (Sandra Torrades Oliva, 2004). Sin embargo, el término de enfermedad desmielinizante suele referirse a la EM por ser la más frecuente y representativa de este grupo de trastornos (Leo & Kipp, 2022; Savransky *et al.*, 2018). Aunque la EM es la enfermedad desmielinizante más frecuente, también se ha observado, disfunción de OLG o destrucción de mielina en otros trastornos del SNC, como la enfermedad de Alzheimer, el accidente cerebrovascular, la lesión medular, la esquizofrenia o la esclerosis lateral amiotrófica (Leo & Kipp, 2022).

2.2 Esclerosis múltiple

La EM es una enfermedad autoinmune del SNC mediada por una alteración de la respuesta inmune en individuos genéticamente predispuestos, está alteración es caracterizada por múltiples lesiones focales que afectan a las vainas de mielina del SNC y que generan una serie de síntomas clínicos causados principalmente por el proceso neuroinflamatorio y desmielinizante (Baecher-allan *et al.*, 2018; Castillo-Álvarez & Marzo-Sola, 2017; Wootla *et al.*, 2012). Las características patológicas de la EM, además de la desmielinización, son la ruptura de la BHE, el reclutamiento de células inmunitarias periféricas, el daño neuronal y axonal, así como la activación de la microglía y los astrocitos (Baecher-allan *et al.*, 2018; Leo & Kipp, 2022). La EM es una enfermedad extremadamente compleja debido a la

variedad de cuadros clínicos que puede presentar según la zona del SNC que se vea afectada, ya sea el cerebro o la médula espinal, y que son específicos de cada paciente, mostrando cada uno, en función de ello, un conjunto particular de desórdenes motores, sensoriales o cognitivos como puede ser: debilidad muscular, entumecimiento o espasmos, pérdida del equilibrio, falta de coordinación, fatiga, incontinencia urinaria e incapacidad mental como: pérdida de memoria, depresión, entre otras (Baecher-allan *et al.*, 2018) ,todos los cuales tienen un efecto perjudicial en la calidad de vida del paciente (Lubrich *et al.*, 2022; Sen *et al.*, 2022).

2.2.1 Epidemiología de la EM

La EM es una enfermedad neurológica incapacitante adquirida en niños, adolescentes y adultos (Blaschek *et al.*, 2018; Wootla *et al.*, 2012). De acuerdo con la información publicada en el año 2020 por la federación internacional de EM (FIEM), existen 2,8 millones de personas con EM en todo el mundo (Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES, s/f). El número estimado de personas con EM en todo el mundo ha aumentado a partir de la cifra de 2,3 millones de personas registrada en 2013 (LaMothe *et al.*, 2018; Macías-Cosme *et al.*, 2012; Terry *et al.*, 2016). Es probable que diversos factores hayan contribuido al aumento observado. Entre estos se incluyen la disponibilidad de métodos de recuento más precisos a nivel nacional y mundial, la mejora en las técnicas de diagnóstico, el aumento de la esperanza de vida de las personas con la enfermedad, así como el crecimiento de la población mundial. Existe una mayor susceptibilidad de la EM en mujeres con una proporción 3:1 respecto a los hombres (Voskuhl *et al.*, 2018). La prevalencia e incidencia de la EM varían significativamente según la región geográfica (Figura 2), con tasas más altas observadas en latitudes más lejanas del ecuador. Kurtzke en 1975, definió tres zonas de prevalencia de EM en el mundo: a) prevalencia alta (>30/100,000 habitantes) comprende el norte de Europa, Estados Unidos de América (E.U.A.), Canadá, sur de Australia y Nueva Zelanda; b) prevalencia media (5-30/100,000 habitantes), donde se abarca el sur de Europa, sur de E.U.A. y el norte de Australia; c) prevalencia baja (<5/100,000 habitantes) se incluye Asia y América del norte (Kurtzke, 1993). Además, en 2010 se determinó que durante la década del 2000 se observó un aumento sostenido en la incidencia de EM en varios países de Europa (Koutsouraki *et al.*, 2010). En el continente americano, los países con mayores tasas de prevalencia y frecuencia de EM son: E.U.A. y Canadá. En el año 2002 se reportó para los E.U.A. una prevalencia media de 85 casos por 100,000 habitantes. Sin embargo, un estudio epidemiológico reciente dirigido por la FIEM señaló que el número de personas con EM en los E.U.A. era de casi 1 millón de personas, esto duplicó significativamente el número informado anteriormente por Kurtzke en

1975 (Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES, s/f). México es considerado un país de baja prevalencia en EM, con 1,5 y 13 casos por 100,000 habitantes. A partir del año del 2008 la FIEM, reportó que la media para los casos de EM para México es de, 9 casos por cada 100,000 habitantes y actualmente se estiman de 0 a 25 casos por 100,000 habitantes (Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES, s/f).

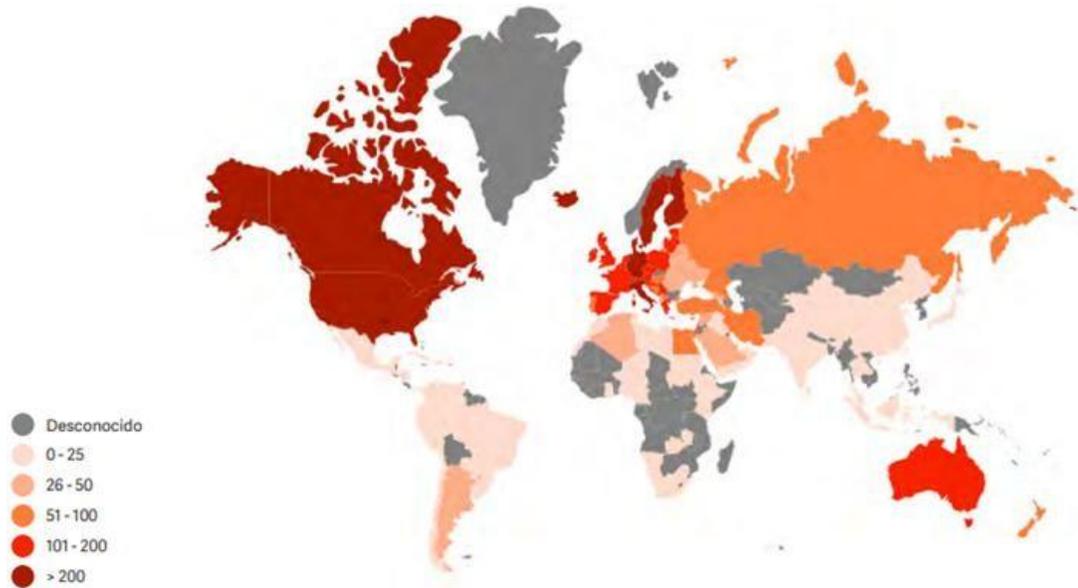


Figura 2. Número de personas con EM: Prevalencia por cada 100,000 personas (Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES, s/f).

2.2.2 Progresión de la EM

El desarrollo clínico de la EM es muy variable: las diferentes etapas de la enfermedad se caracterizan por distintos mecanismos celulares y procesos inflamatorios que dependen de las células inmunitarias residentes en el SNC, como la microglía, y de la infiltración de células inmunitarias periféricas, como las células T y B (Zirngibl *et al.*, 2022). Se han descrito cuatro tipos de evolución clínica: La EM recurrente remitente (EM-RR), primariamente progresiva (EM-PP), secundariamente progresiva (EM-SP) y la progresiva recurrente (EM-PR) (Anisha Doshi & Jeremy Chataway, 2017; Terry *et al.*, 2016). La EM-RR, es más frecuente en mujeres que hombres. Es el tipo más común de EM y se caracteriza por episodios claramente definidos de exacerbaciones (brotes o recaídas), seguidos de periodos de remisión parcial o completa. Durante un brote, los síntomas empeoran o aparecen nuevos síntomas. Los brotes pueden durar días, semanas o meses. En las remisiones, los síntomas mejoran o

desaparecen por completo, y no hay una progresión evidente de la enfermedad entre los brotes. Las fases recurrentes de la EM se caracterizan típicamente por la alteración de la BHE y la subsiguiente infiltración de células T y B. Esta infiltración celular es un precursor clave de la inflamación que contribuye al daño tisular observado en la enfermedad. La EM-PP es más frecuente en hombres que mujeres. Se caracteriza por una progresión constante de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad, sin brotes claros ni remisiones. La enfermedad progresa de manera continua, aunque puede haber periodos de estabilización o incluso pequeñas mejoras temporales. Es menos común que la EM-RR y afecta aproximadamente al 10-15% de las personas con EM. La EM-SP, este tipo suele desarrollarse en personas que inicialmente tienen EM-RR. Después de un periodo de recaídas y remisiones, la enfermedad empieza a progresar de manera constante, con o sin brotes superpuestos. La discapacidad aumenta gradualmente con el tiempo, y las remisiones se vuelven menos frecuentes y completas. La transición de EM-RR a EM-SP puede variar, pero generalmente ocurre entre 10 y 20 años después del diagnóstico inicial. La EM-PR es el tipo más raro de EM. Se caracteriza por una progresión constante de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad, similar a la EM-PP, pero con brotes agudos superpuestos. Los brotes son similares a los de la EM-RR, pero la enfermedad progresa de manera constante entre los brotes (Anisha Doshi & Jeremy Chataway, 2017; Baecherallan *et al.*, 2018; Leo & Kipp, 2022; Terry *et al.*, 2017; Wootla *et al.*, 2012; Zirngibl *et al.*, 2022).

2.2.3 Fisiopatología de la EM

La fisiopatología de la EM aún no se comprende completamente, pero se cree que tiene un componente inmunológico (Wootla *et al.*, 2012). Todavía se desconoce si los procesos inmunológicos comienzan en la periferia o en el SNC, y si son primarios o secundarios en la enfermedad. Sin embargo, a pesar de que la causa principal no ha sido identificada, se ha avanzado en la comprensión de varios aspectos de su etiopatogenia (Slavin *et al.*, 1998). La investigación en modelos animales sobre enfermedades neuroinflamatorias autoinmunes, especialmente la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), ha sido fundamental para elucidar los mecanismos patogénicos involucrados (Miller *et al.*, 2010; Terry *et al.*, 2016). La teoría más ampliamente aceptada en la actualidad sugiere que los pacientes con una susceptibilidad genética en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II tienen células T CD4+ que reaccionan de forma autoinmune en la sangre, dirigidas hacia antígenos específicos presentes en el SNC. Entre estos antígenos se destacan la PLP, PBM y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG) (Peng *et al.*, 2019; Wootla *et al.*, 2012), la reacción puede iniciar por mimetismo molecular, cuando los patógenos tienen

homología estructural con los autoantígenos activan linfocitos T (CD4+ y CD8+) que adquieren la capacidad de atravesar la BHE y llegar al SNC (Schropp *et al.*, 2019). Esta activación se atribuye a la pérdida de la autotolerancia o a la presentación errónea de antígenos debido a infecciones virales u otros factores desencadenantes (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, *et al.*, 2011).

2.2.4 Neuroinflamación en la EM

La inflamación es una de las características principal de la EM. La interacción entre las moléculas de adhesión expresadas en la superficie de las células inmunitarias y las del endotelio vascular es crucial para la migración de linfocitos al SNC (Wootla *et al.*, 2012). Los linfocitos T activados liberan interleucinas (ILs) proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ), que aumentan la expresión de moléculas de adhesión endotelial, como las E-selectinas, la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (Terry *et al.*, 2016). Las E-selectinas forman enlaces débiles con los ligandos de los linfocitos y, junto con las quimioquinas CCL19 y CCL21, ralentizan y permiten el rodamiento de los linfocitos sobre la pared vascular en dirección del flujo sanguíneo (Wootla *et al.*, 2012). Este deslizamiento facilita el cambio conformacional y la activación de las integrinas leucocitarias, como el antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1) y el antígeno muy tardío de tipo 4 (VLA-4). Estas integrinas se unen a sus respectivos ligandos en las células endoteliales, como ICAM-1 y VCAM-1, mediante enlaces estables, lo que permite el paso de las células inmunitarias a través del endotelio, principalmente a nivel de las vénulas postcapilares (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, *et al.*, 2011). Los linfocitos T atraviesan dos membranas basales mediante dos mecanismos: la unión a diversos subtipos de lamininas y la producción de proteasas que degradan la matriz extracelular, como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9). Una vez que los linfocitos T activados entran en el SNC, se dirigen al lugar de la inflamación a través de un gradiente de moléculas quimiotácticas, llamadas quimiocinas, producidas en abundancia en las lesiones inflamatorias (Peng *et al.*, 2019). En el SNC, los linfocitos T CD4+ autorreactivos deben ser estimulados; de lo contrario, mueren o abandonan el SNC. Los linfocitos activados se encuentran con células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos o microglía) que expresan el antígeno causante de la EM en su superficie, presentado por el MHC II (Wootla *et al.*, 2012). Al ser estimulados, los linfocitos T tipo 1 (Th1) producen ILs proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12) y quimiocinas, que inducen la proliferación clonal de linfocitos T, activan macrófagos y microglía, incrementan la expresión de moléculas de adhesión endotelial,

aumentan la permeabilidad de la BHE y permiten un mayor paso de células mononucleares (Miller *et al.*, 2010). Los macrófagos y la microglía secretan mediadores neurotóxicos, como el TNF- α , el óxido nítrico (NO), MMPs y ERO, que contribuyen al daño (Wootla *et al.*, 2012). Paralelamente, los linfocitos T tipo 2 (Th2) liberan ILs antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), que disminuyen el estado proinflamatorio y, además, inducen la activación y proliferación de células B. Las células B se diferencian en células plasmáticas y secretan anticuerpos, que a su vez activan el sistema del complemento y estimulan la opsonización por parte de los macrófagos (Figura 3). Las células T CD8 (citotóxicas) pueden aumentar el daño a través de la producción de ILs, así como de granzimas y perforinas, que pueden seccionar directamente axones (Miller *et al.*, 2010). Recientemente, se ha descrito la implicación de los linfocitos T tipo 17 (Th17) en la fisiopatogenia de la EM. Estas células, una vez activadas, secretan IL-17, promoviendo la movilización de neutrófilos (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, *et al.*, 2011). Además de los mecanismos que inducen la activación de los linfocitos T en la inflamación, existen otros que tratan de frenar su activación excesiva, como las células CD4+CD25+Fox3 reguladoras o células Treg. Estas células son capaces de suprimir la respuesta inmune, ya sea limitando la presentación del antígeno a los linfocitos por parte de las células dendríticas o regulando la proliferación de los linfocitos T ya activados (María Díaz Sánchez, 2014; Peng *et al.*, 2019).

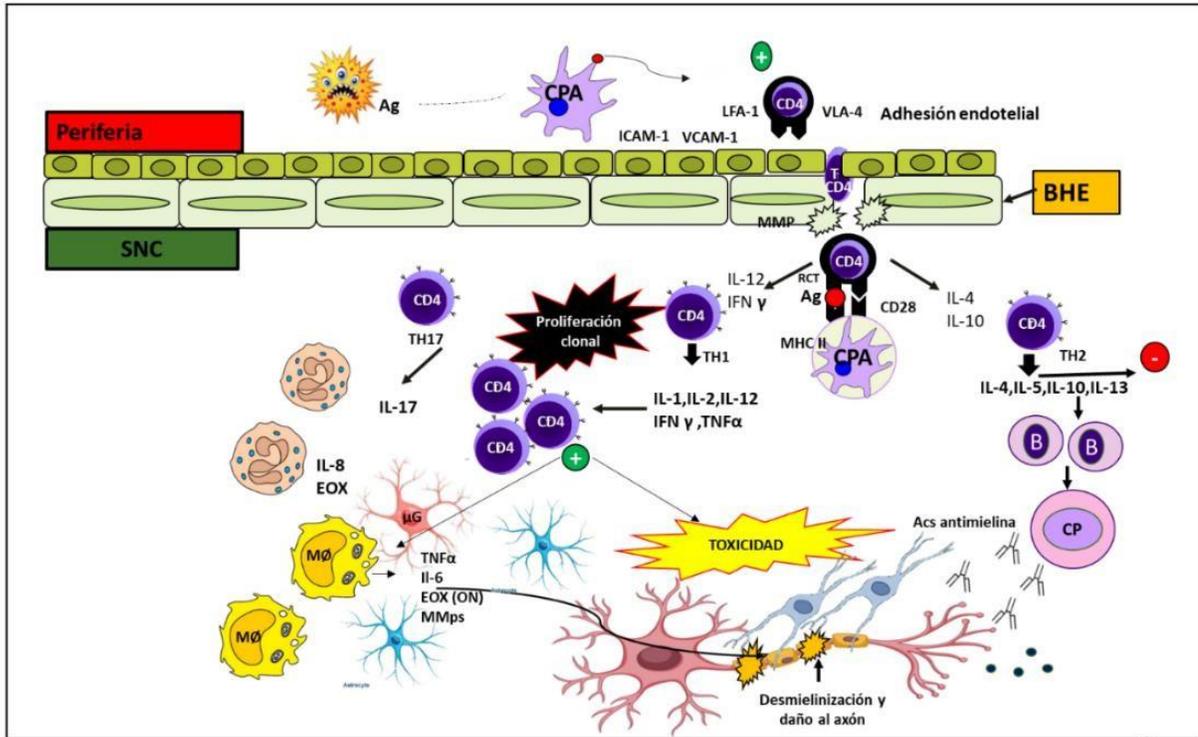


Figura 3. Mecanismo de desarrollo de la EM: En la EM, patógenos que comparten similitudes estructurales con autoantígenos del SNC activan linfocitos T. Estos linfocitos atraviesan la BHE y acceden al SNC, donde requieren de una estimulación continua por células presentadoras de antígenos. Estas células presentan antígenos específicos relacionados con la EM. Los linfocitos Th1 secretan ILs proinflamatorias, que estimulan la proliferación de más linfocitos T, activan macrófagos y microglía, y aumentan la permeabilidad de la BHE. Esta respuesta inflamatoria libera mediadores neurotóxicos como ON y ERO causando daño a la mielina y a los axones. Por otro lado, los linfocitos Th2 producen ILs antiinflamatorias, que moderan la inflamación y fomentan la activación de células B (María Díaz Sánchez, 2014; Peng *et al.*, 2019; Wootla *et al.*, 2012).

2.3 Neurodegeneración en la EM

La EM es una enfermedad neurológica compleja caracterizada por una diversidad de síntomas clínicos, que varían ampliamente según la localización de las lesiones dentro del SNC (Lubrich *et al.*, 2022). Aproximadamente el 80% de los pacientes con EM experimentan alteraciones en las funciones motoras, como dificultades para mantener el equilibrio, reducción de la velocidad al caminar y deterioro de la destreza en manos y pies, lo que afecta considerablemente su calidad de vida (Roosendaal *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2021). Más allá de las lesiones inflamatorias típicamente observadas en la materia

blanca, la desmielinización también afecta extensamente a la materia gris. Esta afectación ha sido consistentemente documentada en estudios histopatológicos y se refleja en hallazgos obtenidos mediante resonancia magnética (RM). Las anomalías en la materia gris se correlacionan estrechamente con déficits tanto motores como sensoriales, subrayando la complejidad de las manifestaciones de la EM. Además, el deterioro cognitivo es una consecuencia significativa de la EM, afectando hasta al 65% de los pacientes (Zhu *et al.*, 2021). Estudios recientes, como el de Bello-Medina y colaboradores (2018), han indicado que la desmielinización en el hipocampo es un factor contribuyente a los déficits cognitivos y a los trastornos mentales observados en estos pacientes. Es probable que una parte considerable del deterioro de la memoria en pacientes con EM esté directamente relacionada con el daño en el hipocampo, lo que sugiere que las intervenciones dirigidas a proteger o restaurar la función del hipocampo podrían mitigar algunos de los impactos cognitivos de la enfermedad. Las anomalías en la materia gris se correlacionan estrechamente con déficits tanto motores como sensoriales, subrayando la complejidad de las manifestaciones de la EM (Bello-Medina *et al.*, 2018).

2.3.1 Hipocampo

El hipocampo es una estructura subcortical de la materia gris ubicada en la parte media del lóbulo temporal en humanos, mientras que en roedores se encuentra en una posición rostrocaudal hacia el lóbulo temporal (Bello-Medina *et al.*, 2018). Esta estructura forma parte del sistema límbico, está estrechamente relacionada con la formación de nuevas memorias y en la navegación espacial ayudando a formar mapas mentales del entorno (David *et al.*, 2015), su importancia se extiende a diversas funciones cognitivas y emocionales, y está implicado en múltiples trastornos neurológicos y psiquiátricos (Chesnokova *et al.*, 2016). El hipocampo tiene una forma curva que se asemeja a un caballito de mar, de donde deriva su nombre (hipocampo, del griego "hippos" que significa caballo y "kampos" que significa monstruo marino). Está formado por el cuerno de Amón (CAm), que se puede segmentar en una "cabeza", un "cuerpo" y una "cola". El CAm también se divide en diferentes regiones (CAm1-CAm4), siendo el CAm4 su parte distal, que se inserta en el giro dentado (Pérez Rando *et al.*, 2023). La región CAm1 y la CAm2 formadas por una zona de pequeñas células piramidales, CAm3 y CAm4 por una zona de grandes células piramidales, cada una con funciones específicas en la memoria y la navegación espacial. El giro dentado (GD) se conforma por pequeñas células granulosas (Amin *et al.*, 2013). El subículo (S) es la continuación hacia afuera de la región CAm1, conectando con

otras áreas del cerebro (Figura 4). Las áreas intermedias entre las zonas compactas de las células comprenden la capa molecular (CM) que consta de procesos neuronales (axones y dendritas), células gliales y células nerviosas dispersas (Amin *et al.*, 2013; Vannson & Gaudron, s/f). El hipocampo también interactúa con la amígdala y otras regiones del cerebro en la regulación de las emociones y memoria (Phelps, 2004).

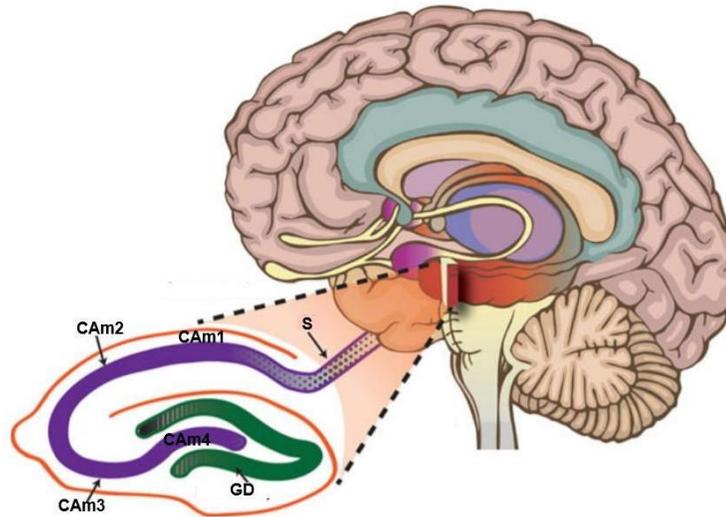


Figura 4. Estructura del hipocampo: El hipocampo está compuesto por varias subestructuras, incluyendo el GD, el CA m (dividido en CA m1, CA m2, CA m3 y CA m4) y el S. El GD, es el sitio de neurogénesis en adultos y es importante para la formación de nuevos recuerdos. Las regiones CA m están involucradas en la transmisión de señales eléctricas y la consolidación de la memoria. El S, actúa como una vía de salida del hipocampo hacia otras partes del cerebro, incluyendo la corteza entorrinal y el sistema límbico, siendo crucial para la integración de información emocional y espacial (Bello-Medina *et al.*, 2018), (imagen tomada de creative diagnostics).

2.3.2 Impacto de las Enfermedades del SNC en el Hipocampo

El hipocampo es una estructura clave que se ve comprometida en una diversidad de patologías del SNC. Entre las enfermedades más relevantes que afectan esta región se encuentran la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia del lóbulo temporal, la depresión, la esquizofrenia y la EM. La enfermedad de Alzheimer comúnmente asociada con la demencia en adultos mayores se caracteriza por una pérdida progresiva del aprendizaje y la memoria. Esta enfermedad impacta severamente el hipocampo, donde la acumulación de depósitos de amiloide y ovillos neurofibrilares conduce a disfunción neuronal y muerte celular. Notablemente, la pérdida de neuronas es un indicador más crítico

de la disminución cognitiva que la propia acumulación de estos depósitos patológicos (Von Gunten *et al.*, 2005). En la epilepsia del lóbulo temporal, el hipocampo se ve profundamente afectado, particularmente las capas piramidales de CA1 y granular del GD. Los pacientes afectados experimentan crisis epilépticas complejas, que impactan considerablemente la memoria y el estado emocional, alterando funciones cognitivas y emocionales debido al papel central del hipocampo en estas áreas (Rincón-López *et al.*, 2017). En el estrés el hipocampo también juega un papel crucial en la modulación de la respuesta al estrés. Posee una alta densidad de receptores para glucocorticoides, los cuales regulan la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). No obstante, la exposición prolongada a estrés puede inducir cambios neurotóxicos, tales como la remodelación dendrítica y la reducción de la neurogénesis, efectos mediados por un aumento en los niveles de corticosteroides (Joca SRL *et al.*, 2003). También se ha asociado la depresión con una reducción del volumen del hipocampo, posiblemente debido a la liberación crónica de cortisol y otros factores de estrés que ejercen efectos neurotóxicos en esta región cerebral. En pacientes con esquizofrenia, se observa una reducción en el volumen de esta zona cerebral, lo que contribuye significativamente a los déficits cognitivos y de memoria que son característicos de esta enfermedad. Esta disminución del volumen puede estar vinculada a alteraciones en la neurotransmisión y la plasticidad sináptica, sugiriendo una relación directa entre la estructura cerebral y la funcionalidad cognitiva (Pérez Rando *et al.*, 2023). Los pacientes con EM presentan desmielinización, daño neuronal y anomalías sinápticas en el hipocampo. Los avances en las técnicas de RM han facilitado la detección del daño hipocampal y la exploración de su relevancia clínica, revelando cómo las desconexiones estructurales y funcionales, junto con lesiones focales y pérdida de tejido, contribuyen al deterioro cognitivo y la depresión (Rocca *et al.*, 2018). Estas enfermedades describen cómo el daño al hipocampo puede manifestarse en una variedad de síntomas cognitivos y conductuales, destacando la importancia crítica de esta estructura en la integridad del SNC.

2.4 Fármacos convencionales

Actualmente, no existe un tratamiento que frene completamente la evolución de la EM. Sin embargo, existen varios fármacos aprobados cuyo objetivo principal es modificar el curso de la enfermedad, reducir la frecuencia de las recaídas y ralentizar la progresión de la discapacidad. Estos tratamientos no tienen efecto sobre las lesiones ya establecidas, por lo que es crucial iniciar el tratamiento lo más pronto posible antes de que aparezcan discapacidades irreversibles. El tratamiento de los síntomas

asociados a la EM se aborda desde dos perspectivas complementarias: la farmacológica, para intentar modificar el curso de la enfermedad, y la rehabilitadora, dirigida a preservar y conservar la funcionalidad en la vida diaria. Los tratamientos farmacológicos para la EM se dividen en tres categorías: 1. Modificadores de la enfermedad; 2. Tratamiento de los síntomas; 3. Tratamientos de los brotes, además de la rehabilitación (Tabla 1). Es importante destacar que el tratamiento de la EM es individualizado y depende de varios factores, como la gravedad de la enfermedad, la frecuencia de los brotes, los síntomas específicos de cada paciente y su respuesta a los medicamentos. Además, la investigación continúa en busca de nuevas terapias que puedan ofrecer mejores resultados para las personas con EM (Martínez Altarriba *et al.*, 2015; Wootla *et al.*, 2012).

Tabla 1: Tratamientos convencionales

		Función
Modificadores de la enfermedad	Interferón beta (IFN- β), Acetato de glatiramer, Natalizumab, Mitoxantrona	Se utilizan para reducir la frecuencia y la gravedad de los brotes, así como para retrasar la progresión de la discapacidad en la EM.
Sintomáticos	Modafinilo para la fatiga. Baclofeno o tizanidina para la espasticidad. Amitriptilina o sertralina para la depresión. Oxitocina o desmopresina para problemas urinarios.	se pueden recetar medicamentos para controlar los síntomas específicos de la EM, como la fatiga, los problemas de espasticidad, los trastornos del movimiento, la depresión y la disfunción urinaria.
Recaídas o brotes agudos	Metilprednisolona	En casos de brotes agudos de la enfermedad, se administran corticosteroides, que por sus propiedades antiinflamatorias pueden acelerar la recuperación.

(Martínez Altarriba *et al.*, 2015; Meca-Lallana *et al.*, 2014; Prieto González, 2014).

2.4.1 Prednisona

La prednisona (PDN) es un fármaco inmunosupresor de uso clínico, comúnmente prescrito para enfermedades como la artritis reumatoide y afecciones inflamatorias pulmonares, como el asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Como glucocorticoide (GC), la PDN es lipofílica y ejerce sus efectos principalmente a nivel genómico mediante el receptor citoplasmático de GC (cGCR). Después de atravesar la membrana plasmática, la PDN se une al cGCR, que forma parte de un complejo multiproteico. Las proteínas asociadas al complejo se disocian, permitiendo que

el complejo GC-cGCR se traslade al núcleo. Dentro del núcleo, el complejo GC-cGCR se une a sitios específicos de unión al ADN conocidos como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Esta interacción puede resultar en una mayor producción de proteínas antiinflamatorias (transactivación) o en una expresión reducida de proteínas proinflamatorias debido a la interferencia negativa con otros factores de transcripción (transrepresión). Ambos procesos de transactivación y transrepresión contribuyen a la inmunosupresión, lo que hace de la PDN un tratamiento efectivo para diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Los efectos secundarios metabólicos típicos de la PDN son en gran medida causados por la transactivación. (Buttgereit *et al.*, s/f; Krasselt & Baerwald, 2016).

2.4.2 Silimarina

La silimarina, es un derivado de *Silybum marianum*, ha sido utilizada durante siglos como remedio herbal para diversas afecciones, especialmente aquellas relacionadas con el hígado como la cirrosis, la hepatitis crónica y las enfermedades hepáticas asociadas con el consumo de alcohol y la exposición a toxinas ambientales (Kren & Walterová, 2005). Químicamente, la silimarina (SLM) es una mezcla de flavonoides polifenólicos, compuesta por un 70-80% de flavonolignanos, un 20-35% de ácidos grasos y otros componentes polifenólicos. Entre los flavonolignanos, la silibinina (en forma de silibina A y silibina B) es el principal compuesto activo, constituyendo aproximadamente el 60-70% de la mezcla. Otros flavonolignanos incluyen isosilibina (5%), silicristina (20%) y silidianina (10%), y otros en menor cantidad (Wadhwa *et al.*, 2022). La evidencia de investigaciones preclínicas y clínicas ha demostrado que la SLM y sus flavonolignanos poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y proapoptóticas, induciendo numerosas actividades biológicas y farmacológicas. Entre estas se incluyen hepatoprotección, neuroprotección, efectos antidiabéticos, anticancerígenos, cardioprotectores, fotoprotectores e inmunomoduladores. Estos efectos se deben a su capacidad para modular múltiples vías celulares y moleculares, como MAPK, mTOR, β -catenina, Akt y NF- κ B, además de interactuar con diversos receptores y factores de crecimiento. Asimismo, la SLM inhibe varias enzimas clave, particularmente aquellas relacionadas con la producción de ERO y vías inflamatorias. Un ejemplo destacado es su acción sobre las isoenzimas del citocromo P450 (CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6), cuya inhibición contribuye a la protección hepática y a la reducción del daño inducido por fármacos. Este amplio espectro de actividades subraya la versatilidad de la SLM en la medicina moderna, proporcionando beneficios multifacéticos para la salud y el bienestar. (Guo *et al.*, 2019; Wadhwa *et al.*, 2022). En los E.U., no existe un control de calidad ni una regulación de los compuestos

herbales como la SLM, ya que no se consideran medicamentos y no están bajo la supervisión de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los E.U. (Wadhwa *et al.*, 2022). Sin embargo, debido a su excelente eficacia terapéutica, es uno de los complementos alimenticios más utilizados y existen en el mercado alrededor de 75 marcas de SLM en diferentes formas farmacéuticas (comprimidos, cápsulas, jarabes, etc.), (Guo *et al.*, 2019; Wadhwa *et al.*, 2022). En este estudio, utilizamos a SLM como parte de los tratamientos farmacológicos por su efecto neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas y trastornos mentales.

2.5 Modelos murinos experimentales útiles en el estudio de la EM

El desarrollo de modelos experimentales es un elemento importante para avanzar en el conocimiento de las enfermedades y en la búsqueda de terapias específicas y efectivas. Debido a los diferentes mecanismos celulares que caracterizan las diferentes etapas de la EM, el modelo experimental de la enfermedad se ve dificultado por el hecho de que esta enfermedad solo aparece en el humano y las enfermedades desmielinizantes en animales, muestran diferencias importantes sobre cualquier enfermedad humana que comprometa el SNC (García-Díaz & Estivill-Torrús, 2008). Por lo tanto, la búsqueda de modelos animales para las enfermedades desmielinizantes ha conducido a modelos *in vitro* e *in vivo*. Los modelos *in vitro* consisten en cultivos celulares de células aisladas del cerebro de mamíferos o de líneas de células inmortalizadas que permiten estudiar las interacciones entre sus células. Estas líneas celulares pueden ser transformadas genéticamente, las cuales son estables y pueden ser sometidas a diversas condiciones experimentales. Los modelos experimentales *in vivo* aplicables en la EM pueden clasificarse en tres grupos: 1) modelos autoinmunes y/o inflamatorios, como la encefalitis autoinmune experimental (EAE) y aquellos desencadenados por virus; 2) modelos de desmielinización-remielinización, incluyéndose las lesiones químicas por cuprizona (CPZ), lisolecitina, bromuro de etidio, así como el modelo del pez cebra, 3) los modelos transgénicos, los cuales se intentan acercar de manera más similar a la enfermedad (Torre-Fuentes *et al.*, 2019; Zirngibl *et al.*, 2022). Dentro de los modelos más utilizados para el estudio de la EM, está el de EAE y el de intoxicación por CPZ (Sen *et al.*, 2022). La CPZ (Bis(ciclohexanona)oxaldihidrazona) es un quelante de cobre que, conduce a la inhibición de las enzimas mitocondriales dependientes del cobre citocromo oxidasa y monoaminoxidasa. Por lo tanto, una hipótesis es que la alteración en el metabolismo energético conduce a la apoptosis en los OLG (Torkildsen *et al.*, 2008), y, por lo tanto, la pérdida de mielina, en regiones específicas del cerebro, (Zirngibl *et al.*, 2022).

2.5.1 Modelo murino de desmielinización inducido por CPZ

Para inducir desmielinización aguda, los ratones son intoxicados con 0.2% de CPZ mezclada con alimento para roedores durante cinco a seis semanas (Gudi *et al.*, 2014; Zhan *et al.*, 2020; Zirngibl *et al.*, 2022) o hasta doce semanas para obtener lesiones crónicas por desmielinización. El grado de desmielinización, también dependerá de la cepa del ratón, la dosis de CPZ, la edad o sexo del animal (Silvestroff *et al.*, 2010). El modelo de CPZ no replican completamente la EM, pero proporciona información valiosa sobre los procesos de reparación de la mielina y refleja varias características importantes del curso progresivo de la EM (Gudi *et al.*, 2014; Torkildsen *et al.*, 2008; Zirngibl *et al.*, 2022). Se ha descrito que este modelo, causa daños menores a BHE, sin embargo, los mediadores proinflamatorios derivados de la microglía y astrogliá crean un entorno inflamatorio local que probablemente desestabiliza la integridad de la BHE e induce edema (Berghoff *et al.*, 2017). Este modelo tiene la ventaja de que, una vez que se suspende la administración, se desencadena un proceso espontáneo de remielinización permitiendo el estudio de ambos mecanismos. Otra de las grandes ventajas es que el compuesto provoca una supresión de linfocitos T permitiendo observar los procesos de desmielinización y remielinización espontanea de los OLG que son específicamente vulnerables a la intoxicación por CPZ, separando los efectos inducidos por la activación del sistema inmune (Figura 5), (Gudi *et al.*, 2014; Kopanitsa *et al.*, 2021).

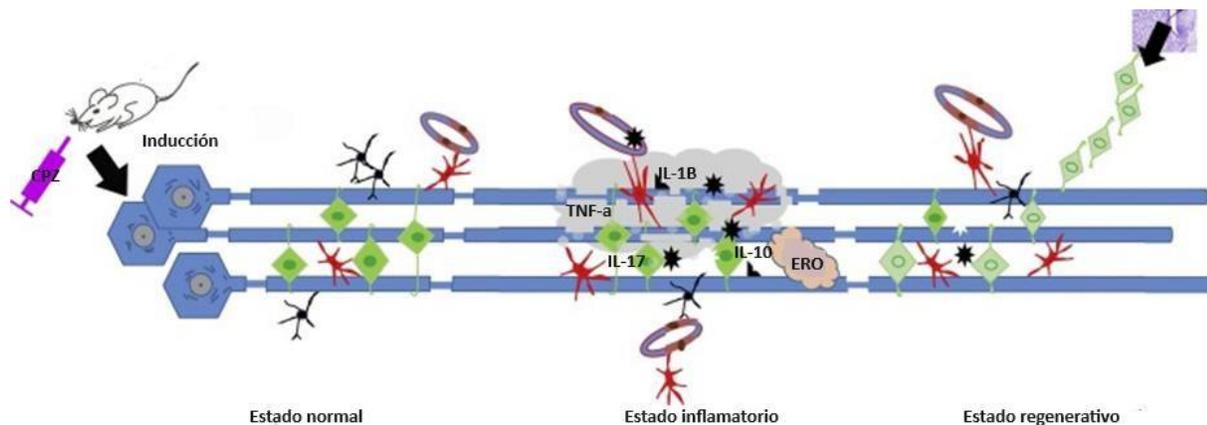


Figura 5. Modelo de inducción por CPZ: La administración de CPZ crea un microambiente que induce la activación secundaria de microglía, producción de ERO, y liberación de ILs inflamatorias junto con gliosis reactiva, culminando en la pérdida de vainas de mielina y de OLG. En la fase regenerativa, se reduce la cantidad de células inflamatorias activas (astrocitos y microglía) y se observa migración de CPO que inician la remielinización (Torre-Fuentes *et al.*, 2019).

2.6 *Tagetes lucida* Cav

Tagetes lucida Cav. es una planta aromática nativa que ha sido y sigue siendo una de las más importantes en rituales tradicionales (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Pertenece al género *Tagetes* y a la familia Asteraceae (Tabla 2). Es conocida como "pericón", "anisillo", "hierba anís", "hierba de Santa María" y "hierba de San Juan" (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008; Heike Vibrans (ed.), 2009). Su área de origen se encuentra en México y Guatemala, formando parte de la vegetación natural en campos abiertos y orillas de bosques de pino y encino, sin ser un problema para la conservación (Capunzo *et al.*, 2003; Villaseñor Ríos & García, 1998). De este género, se han reportado 56 especies en América, de las cuales entre 24 y 28 están en nuestro país (Capunzo *et al.*, 2003; Salehi *et al.*, 2018; Villaseñor Ríos & García, 1998). *Tagetes lucida* (*T. lucida*) es una planta típica de regiones templadas, conocida por los aztecas como "Yauhtl", derivado de la palabra azteca "ujana", que significa "ofrecer incienso en los sacrificios" (Guzmán Gutiérrez *et al.*, 2014; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). La planta se utilizaba en rituales de incienso y para adornar altares durante celebraciones como el día de muertos, en algunas regiones. Las hojas y flores se utilizan como condimento, añadiendo su característico sabor a sopas, guisos y bebidas (Guzmán Gutiérrez *et al.*, 2014) y, su amplio uso por sus propiedades medicinales (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2020; Salehi *et al.*, 2018). *T. lucida* es una planta herbácea perenne, erecta, de hasta 80 cm de alto, con uno o varios tallos ramificados desde la base. Tiene hojas simples, opuestas, indivisas, sésiles, de 2 a 10 cm de largo y de 0.5 a 2 cm de ancho, lineares a oblongas o elípticas a oblanceoladas, con márgenes aserrados y de color verde (Figura 6a). tiene inflorescencia que se componen de cabezuelas dispuestas en corimbos sobre pedúnculos bracteados de hasta 1 cm de largo. El involucre es cilíndrico, de 4 a 12 mm de alto, con 5 a 7 brácteas de ápices subulados (Figura 6b). Las cabezuelas contienen flores liguladas (3 o 4), de color amarillo, con láminas flaveladas o suborbiculares, de 3 a 6 mm de largo, y flores del disco de 5 a 8, con corolas amarillas, de 4 a 6 mm de largo (Figura 6c), da frutos y semilla, y emite un aroma a anís (descripción Basada en Rzedowski y Rzedowski, 2001) ;(Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008; Heike Vibrans (ed.), 2009).

Tabla 2: Taxonomía de *Tagetes lucida* Cav

Reino	Plantae
Sub-reino	Traqueobionta
Supervisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes</i>
Especie	<i>T. lucida</i> Cav.

(Heike Vibrans (ed.), 2009)

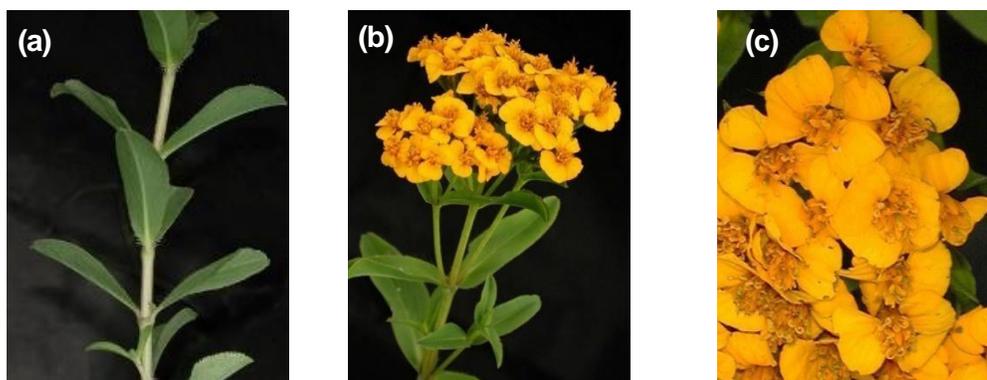


Figura 6. Características de *T. lucida*. (a) Hojas (b) Inflorescencia (c) Cabezuelas o flores (Fotos tomadas de la red).

2.6.1 Usos medicinales de *T. lucida*

Desde la época prehispánica, *T. lucida*, ya sea como planta completa o en partes (raíces, hojas, flores y tallos), es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades (Bonilla-Jaime *et al.*, 2015; Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008; Pérez-Ortega *et al.*, 2016), sus aplicaciones terapéuticas están escritas en varios documentos y códices del siglo XVI (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008). Además de la literatura, los informes verbales de comerciantes y curanderos de las regiones mexicanas han indicado que *T. lucida* es una planta útil para el tratamiento de afecciones gastrointestinales que involucran cólicos, úlceras, diarrea, disentería, empacho, vomito y tifoidea.

También ha sido utilizada para tratar infecciones de vías urinarias por su efecto antimicrobiano, reumatismo, asma, varices, resfriados, carminativo, antihelmíntico, inflamación y enfermedades neurológicas relacionadas con trastornos emocionales, como el miedo, la ansiedad, la depresión, la irritabilidad y los nervios (Bonilla-Jaime *et al.*, 2015; Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008; Monterrosas-brisson *et al.*, 2020; Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Porras-Dávila *et al.*, 2022a). Otros usos reportados son que, al quemar la planta, el humo generado sirve para ahuyentar mosquitos, y cuando se aplica tópicamente es un buen repelente. Sus hojas se administran para tratar el eccema. Al fumarse, parece tener efectos alucinógenos y afrodisíacos. Los curanderos tradicionales mexicanos recomiendan consumir las partes aéreas por vía oral en infusión y en extractos hidroalcohólicos (Mata-Pinzón *et al.*, 2018; Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Sierra Carrillo, 2000).

2.6.2 Neurofarmacología de *T. lucida*

El interés por la investigación básica y la aplicación de *T. lucida* ha sido principalmente por su amplia historia sobre su uso en la medicina tradicional y en el campo de la agricultura por sus actividades fungicidas, bactericidas e insecticidas. Hoy en día, existe información científica sobre el uso de esta planta, varios autores han demostrado la actividad biológica de *T. lucida* en distintas enfermedades. Los estudios farmacológicos sobre *T. lucida* han reportado propiedades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatoria y su potencial impacto sobre enfermedades del SNC, siendo útil como: antinociceptiva, antidepressiva, ansiolítica, antipsicosis y sedante, por mencionar algunas (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008; Hernández-León & Narv, 2020; Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Porras-Dávila *et al.*, 2022b).

Propiedad antinociceptiva: En 2019, González-Trujano y colaboradores investigaron las propiedades antinociceptivas de un extracto etanólico de *T. lucida* y sus componentes bioactivos, incluyendo quercetagina 7-O- β -d-glucósido y escoporona, utilizando modelos de dolor en animales, como el retorcimiento y la prueba de formalina. El estudio comparó los efectos antinociceptivos del extracto y sus fracciones con medicamentos estándar como tramadol, diclofenaco y ketorolaco, y se evaluó la participación de los receptores opioides y 5-HT_{1A} a través de los antagonistas naloxona y WAY100635, respectivamente. Los resultados mostraron que el extracto etanólico y sus fracciones tuvieron una respuesta antinociceptiva significativa, comparable a los fármacos de referencia. Además, el extracto demostró no producir daño gástrico, y cuando se combinó con ketorolaco, mitigó el daño gástrico causado por este último, destacando su potencial como un analgésico efectivo sin

efectos adversos gastrointestinales (González-Trujano *et al.*, 2019). En 2020, Hernández-León y colaboradores investigaron la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria del aceite esencial de *T. lucida* y del metabolito β -cariofileno, utilizando modelos de dolor en animales. Los ensayos se realizaron con dosis que variaron de 0.1 a 10 mg/kg para el aceite esencial y de 3.16 a 10 mg/kg para el β -cariofileno. Los resultados demostraron que tanto el aceite esencial y el β -cariofileno, proporcionaron una significativa respuesta antinociceptiva, la cual fue dependiente de la dosis y no causaron daño gástrico, en comparación con metamizol e indometacina, los fármacos de referencia utilizados. Además, se descubrió que la actividad analgésica del β -cariofileno está mediada por la interacción con varios receptores, incluyendo los opioides, benzodiazepinas, el receptor de serotonina 1A (5-HT_{1A}) así como el ON (Hernández León & Narv, 2020).

Propiedades como ansiolítico y sedante: Pérez Ortega y colaboradores en el 2016, evaluaron la actividad ansiolítica y sedante de *T. lucida* en ratones, utilizando pruebas como: CA, cilindro de exploración, tablero de agujeros, laberinto en cruz y la potenciación de la hipnosis inducida por barbitúricos. Los resultados mostraron que los extractos polares de *T. lucida* inhibían la ansiedad y tenían efectos sedantes. Estos efectos se bloquearon en presencia de antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y GABA/BDZ, indicando que los compuestos activos interactúan con los sistemas de neurotransmisión serotoninérgica y GABAérgica, y se identificó la dimetilfraxetina como un posible compuesto responsable de ambas actividades (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

Propiedad antidepresiva: En 2008, Guadarrama Cruz y colaboradores investigaron los efectos antidepresivos de diferentes dosis del extracto acuoso de *T. lucida* (5, 10, 50, 100 y 200 mg/kg/día) administradas durante 14 días a ratas. El estudio también evaluó los posibles efectos adversos sobre el comportamiento sexual masculino (CSM). Los hallazgos indicaron que las dosis de 10, 50 y 100 mg/(kg/día) del extracto acuoso de *T. lucida* disminuyeron significativamente la inmovilidad y aumentaron la natación en la prueba de nado forzado (NF), sin influir en el comportamiento de escalada. Estas mismas dosis no alteraron la actividad motora ni el CSM, en comparación con la fluoxetina (10 mg/kg por día). Los resultados concluyen que el extracto de *T. lucida* tiene propiedades antidepresivas en ratas, sin afectar negativamente la actividad motora ni el comportamiento sexual, respaldando su uso en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la depresión (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008). También, en 2012, Guadarrama Cruz y colaboradores investigaron los efectos de diversos extractos de *T. lucida* (metanol, Hx, diclorometano y acuoso en dosis de 10 y 50 mg/kg) administrados oralmente a ratas durante 14 días, utilizando la prueba de NF para evaluar el potencial antidepresivo y la implicación del sistema serotoninérgico, además de estudiar su toxicidad. Los resultados indicaron que únicamente el extracto acuoso a 50 mg/kg redujo

significativamente la inmovilidad y aumentó la actividad en la NF, mostrando un efecto comparable al de la fluoxetina (5 mg/kg). El efecto antidepresivo del extracto acuoso fue evidente después de 7 días de tratamiento. Además, el pretratamiento con PCPA (un inhibidor de la síntesis de serotonina, 100 mg/kg/día durante 4 días) bloqueó los efectos antidepresivos tanto del extracto acuoso como de la fluoxetina, sugiriendo que estos efectos son mediados por el sistema serotoninérgico. El estudio concluyó que el extracto acuoso de *T. lucida* es efectivo como antidepresivo en la prueba de NF, sin efectos adversos significativos (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2012). En 2015, Bonilla Jaime y colaboradores investigaron cómo el sistema serotoninérgico influye en el efecto antidepresivo del extracto acuoso de *T. lucida* en ratas, utilizando la prueba de NF. Administraron diferentes dosis del extracto en varios intervalos antes de la prueba (72, 48, 24, 18 y 1 hora). Además, los animales fueron pretratados con antagonistas de los receptores serotoninérgicos (5-HT1A y 5-HT2A), noradrenérgicos (β y α 2) y un inhibidor de la síntesis de serotonina (PCPA), combinados con el extracto. Los resultados revelaron que el extracto acuoso de *T. lucida* redujo la inmovilidad y aumentó la natación y la escalada en las ratas, mostrando un perfil similar a los antidepresivos tradicionales. Además, una dosis subóptima del agonista 5-HT1A (8-OH-DPAT) potenció los efectos antidepresivos del extracto. Los efectos antidepresivos del extracto fueron bloqueados por los antagonistas de los receptores 5-HT1A (WAY-100635) y 5-HT2A (ketanserina), así como por el inhibidor de la síntesis de serotonina (PCPA), pero no se vieron afectados por antagonistas β -noradrenérgicos (propranolol) ni α 2-noradrenérgicos (yohimbina). Concluyendo que el extracto acuoso de *T. lucida* ejerce su efecto antidepresivo principalmente a través de la modulación de la liberación y recaptación de serotonina (Bonilla-Jaime *et al.*, 2015).

Propiedad como antiinflamatorio: En 2020, Monterrosas y colaboradores investigaron la actividad antiinflamatoria de extractos de hexano y acetona de *T. lucida*, utilizando un modelo de edema auricular inducido por TPA en ratones. Los resultados mostraron que el extracto de hexano redujo significativamente el edema con una eficacia comparable a la indometacina, alcanzando una inhibición del edema del 91.1%. Además, el estudio incluyó un análisis químico detallado, mediante el cual se aislaron e identificaron cinco cumarinas bioactivas del extracto de hexano. Estas incluyen la 7-isopreniloxicumarina (IC), herniarina (HN), dimetilfraxetina (DF), escoporona (SC) y 7-O-prenil-escopoletina (PE). Los resultados indicaron que las cumarinas IC y HN disminuyeron de manera significativa el edema inducido por TPA, con reducciones del 81.1% y 54.4%, respectivamente. En contraste, las otras tres cumarinas mostraron una inhibición menor del edema, cada una con menos del 50% de efectividad. Además, los tratamientos con las cumarinas IC y HN, junto con los extractos de hexano y acetona, no solo redujeron el grosor y el edema de la oreja, sino que también controlaron

el infiltrado celular, según su análisis histológico (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020). En 2022, Porras Dávila y colaboradores llevaron a cabo un estudio exhaustivo centrado en el aislamiento y la caracterización química de cumarinas, flavonoides y terpenos presentes en *T. lucida*. El trabajo no solo profundizó en la comprensión de la composición química de esta planta, sino que también destacó significativamente su potencial antiinflamatorio. La investigación aportó valiosos datos sobre la actividad antiinflamatoria de *T. lucida* (Porras Dávila *et al.*, 2022a).

Propiedad antipsicótica: En 2022, Porras Dávila y colaboradores investigaron los efectos de extractos de *T. lucida* y dos cumarinas aisladas, HN y DF, en modelos de ratones ICR para evaluar la catalepsia inducida por haloperidol y las conductas psicóticas provocadas por ketamina. Los resultados revelaron que los extractos y las cumarinas incrementaron el efecto cataléptico de haloperidol. Además, estos agentes contrarrestaron varios efectos de la ketamina, incluyendo el comportamiento estereotipado, la hiperlocomoción, el deterioro cognitivo y la alteración de la interacción social. Sin embargo, solo el extracto de metanol fue efectivo en bloquear la actividad de la ketamina en la prueba de NF. Este estudio destacó la interacción de *T. lucida* con los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico, concluyendo que los extractos y cumarinas tienen un potencial terapéutico para mitigar efectos de las conductas psicóticas inducidas por ketamina y potenciar la catalepsia por haloperidol (Porras-Dávila *et al.*, 2022b).

Efecto neuroprotector e inmunomodulador. En 2022 y 2023, Santibáñez y colaboradores llevaron a cabo estudios detallados sobre las propiedades antineuroinflamatorias de las cumarinas extraídas de *T. lucida*, incluyendo la IC, HN, DF, SC y PE. Los estudios implicaron evaluaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas en modelos de neuroinflamación inducida por lipopolisacáridos (LPS), utilizando un método bioanalítico por HPLC-DAD-UV para la cuantificación simultánea de las cumarinas en muestras de plasma, cerebro, riñón y bazo. Los resultados de 2022 mostraron que las concentraciones plasmáticas de cumarinas aumentaron hasta tres veces en el modelo de neuroinflamación comparado con ratones sanos. En 2023, se encontró que las dosis de 10 y 20 mg/kg de estas cumarinas eran particularmente efectivas y duraderas en términos de sus efectos neuroprotectores e inmunomoduladores. Los efectos protectores se asociaron principalmente con HN, DF y SC, debido a su estructura y biodisponibilidad en plasma y tejido cerebral. En conclusión, estos estudios confirmaron que *T. lucida* posee propiedades como neuroprotector e inmunomodulador, destacando su potencial en el tratamiento de condiciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas (Santibáñez *et al.*, 2022, 2023).

3 JUSTIFICACION

La EM es una enfermedad autoinmune crónica, probablemente desencadenada por factores ambientales en individuos con predisposición genética. A nivel mundial, se estima que la EM afecta a aproximadamente 2.8 millones de personas, con una prevalencia que varía considerablemente según la región geográfica. En Europa, se registran 133 casos por cada 100,000 habitantes, mientras que en América la prevalencia es de 112 casos por cada 100,000. En la región del Mediterráneo Oriental, esta cifra disminuye a 30 casos, y en el Sudeste Asiático a 9 casos por cada 100,000 habitantes. Las regiones de África y el Pacífico Occidental presentan las tasas más bajas, con menos de 5 casos por cada 100,000 habitantes. En México, aunque no se ha establecido con precisión la incidencia de la EM, se considera que el país tiene una baja prevalencia, con una estimación de entre 0 y 25 casos por cada 100,000 habitantes. La etiología de esta enfermedad sigue siendo desconocida, por lo que los tratamientos convencionales se enfocan en modificar el curso de la enfermedad sin llegar a curarla. En años recientes, se ha propuesto el uso de compuestos químicos derivados de plantas medicinales para controlar los procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos. *Tagetes lucida* es una planta medicinal de México, conocida por sus propiedades etnobotánicas y su uso en el tratamiento de diversas enfermedades como afecciones gastrointestinales, úlceras, dolor musculoesquelético, enfermedades del SNC e inflamación. Basándonos en antecedentes científicos, tomaremos como referencia la investigación realizada por Monterrosas y colaboradores en 2020, en la cual se identificaron y aislaron cinco cumarinas de un extracto de hexano de *T. lucida*. En dicho estudio, se evaluó el efecto antiinflamatorio de estas cumarinas y del extracto en un modelo de edema auricular inducido por TPA en ratones, demostrando su efecto antiinflamatorio. La finalidad de este proyecto es sentar las bases para continuar la investigación de los mecanismos moleculares por los cuales los extractos y/o los compuestos activos ejercen el efecto neuroprotector, para en un futuro diseñar un fitomedicamento a partir de *T. lucida* capaz de controlar la neuroinflamación y la neurodegeneración, dos características clave de la EM.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los extractos y cumarinas aisladas de *T. lucida* tienen efecto neuroprotector e inmunomodulador en un modelo murino de desmielinización inducido por CPZ?

5 HIPOTESIS

Los extractos de TIHx, TIAcOEt y las cumarinas aisladas de *T. lucida* tienen efecto neuroprotector e inmunomodulador en ratones con daño motor y neuroinflamación asociada a la desmielinización inducida por la administración de CPZ.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector e inmunomodulador de dos extractos, así como de las cumarinas: herniarina, escoporona, dimetilfraxetina, 7-isopreniloxicumarina y 7-O-prenilescopoletina, aisladas de *T. lucida*, en un modelo murino de desmielinización inducida por CPZ.

6.1.1 Objetivos particulares

- 1.- Aislar e identificar de los extractos TIHx, TIAcOEt, las cumarinas: herniarina, escoporona, dimetilfraxetina, 7-isopreniloxicumarina y 7-O-prenilescopoletina con efecto neuroprotector e inmunomodulador, utilizando técnicas de cromatografía.
- 2.- Evaluar el efecto neuroprotector de TIHx, TIAcOEt y de las cinco cumarinas aisladas de *T. lucida*, sobre el comportamiento en ratones con desmielinización generado por la administración forzada de CPZ.
- 3.- Medir la capacidad de TIHx, TIAcOEt y cinco cumarinas de *T. lucida* para controlar la extravasación plasmática en cerebro de ratones con desmielinización inducida por la administración forzada de CPZ.
- 4.- Analizar el efecto inmunomodulador de TIHx, TIAcOEt y cinco cumarinas de *T. lucida* a través de la cuantificación de interleucinas en cerebro de ratones con desmielinización inducida por la administración forzada de CPZ.
- 5.- Evaluar la capacidad de TIHx, TIAcOEt y cinco cumarinas de *T. lucida* sobre el daño en cerebro de ratones con desmielinización por la administración forzada de CPZ a través de un estudio histopatológico utilizando la tinción H&E.

7 MATERIAL Y METODOS

7.1 Obtención de la planta y extractos de: Hexano y Acetato de Etilo

En septiembre de 2020, se adquirieron 18 kg de *T. lucida* a través de productores locales en el municipio de Xochitepec, Morelos, México. Un ejemplar fue enviado al herbario del Jardín Etnobotánico en Cuernavaca, Morelos (Instituto Nacional de Antropología e Historia), para su clasificación taxonómica por las Maestras en Ciencias Margarita Ávilez y Macrina Fuentes. Las flores, hojas y tallos del material vegetal se dejaron secar a la sombra durante tres semanas a temperatura ambiente. Una vez secos, los materiales fueron triturados en un molino eléctrico Pulve Plastic (EUA) hasta obtener partículas de 4 mm de tamaño. Para la obtención de los extractos, se procesaron 9 kg de material vegetal triturado, los cuales se colocaron en un recipiente de vidrio con capacidad de 20 litros. Se llevaron a cabo tres extracciones secuenciales exhaustivas mediante maceración, utilizando hexano (Hx) en una proporción 1:2 (peso/volumen) durante 24 horas a temperatura ambiente. El extracto se concentró mediante destilación a presión reducida en un rotavapor (Büchi R-114, Büchi Labortechnik, Flawil, Suiza) a 40°C, con presión controlada y 81 rpm, obteniéndose así el extracto de hexano con un rendimiento de 320 g (TIHx). El material vegetal residual, una vez seco, se sometió a un nuevo proceso de maceración con acetato de etilo (AcOEt) por 24 horas, repitiéndose el procedimiento tres veces. Posteriormente, el solvente se eliminó mediante rotavapor para obtener el extracto de acetato de etilo con rendimiento de 650 g (TIAcOEt). Los extractos fueron liofilizados y almacenados a 4 °C para su posterior uso (Figura 7).

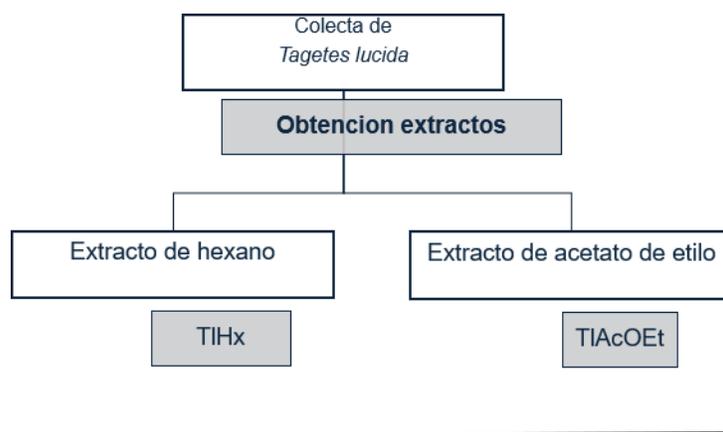


Figura 7. Diagrama experimental del análisis químico de los extractos de *T. lucida*. CCA. Cromatografía en columna abierta; CCF, cromatografía en capa fina y CLAR, Cromatografía líquida de alta resolución.

7.2 Fraccionamiento químico de los TIHx y TIAcOEt

Para separar los compuestos químicos contenidos en los extractos de *T. lucida* (TIHx y TIAcOEt), se sometieron a fraccionamiento químico mediante la técnica de cromatografía en columna abierta (CCA). Se utilizó sílica gel 60 en fase normal (FN) (109385, Merck KGaA) como fase estacionaria y un sistema de gradiente Hx/AcOEt como fase móvil. El proceso de separación comenzó con un sistema de 100 % Hx, seguido de un sistema Hx/AcOEt en una proporción de 90/10. Este sistema se cambió cada vez que se recolectaban 5 fracciones (F) de 300 ml cada una, las fracciones fueron concentradas por destilación a presión reducida y analizadas por cromatografía en capa fina, para el monitoreo del perfil químico en cada muestra. Con este procedimiento, se obtuvieron 46 fracciones (TIHx) y 57 fracciones para (TIAcOEt) y las que presentaron el mismo perfil químico fueron agrupadas para continuar con su análisis (Tabla 3).

Tabla 3. Sistema de separación de los extractos TIHx y TIAcOEt

Sistema de recolección	Columna 1, TIHx	Columna 2, TIAcOEt
100% Hx	F1-F5	F1-F5
90:10 Hx/AcOEt	F6-F10	F6-F11
80:20 Hx/AcOEt	F11-F16	F12-F17
70:30 Hx/AcOEt	F17-F21	F18-F22
60:40 Hx/AcOEt	F22-F26	F23-F27
50:50 Hx/AcOEt	F27-F31	F28-32
40:60 Hx/AcOEt	-----	F33-F37
30:70 Hx/AcOEt	F32-F36	F38-42
20:80 Hx/AcoEt	-----	F43-F45
100% Hx/AcOEt	F37-F41	F46-F48
100% MeOH	F42-F46	F52-F57

F=Fracciones, Hx= Hexano, AcOEt= acetato de etilo, MeOH= Metanol

7.2.1 Agrupación de fracciones con similitud química del extracto TIHx

Después del fraccionamiento químico del extracto TIHx y la caracterización de las fracciones mediante cromatografía en capa fina, se agruparon las fracciones con perfiles químicos similares. Las fracciones F1 a F5, que contenían predominantemente la IC, se combinaron para su análisis posterior. De manera similar, las fracciones F6 a F11, con una alta concentración de HN, se agruparon debido a la homogeneidad en su composición. Las fracciones F13 a F26 se caracterizaron por tener como componente principal a la DF. Finalmente, las fracciones F27 a F37 contenían mayoritariamente SC, mientras que las fracciones F43 a F46 presentaron una concentración predominante de PE.

Los perfiles de las fracciones mostraron que, aunque un compuesto predominaba en cada una de ellas, todavía se detectaron pequeñas cantidades de otros compuestos. Finalmente, obtuvimos cinco mezclas distintas de las fracciones, cada una constituida principalmente por un compuesto mayoritario específico.

7.3 Determinación del perfil fitoquímico por Cromatografía en Capa Fina

Con la finalidad de determinar el perfil químico de los extractos y fracciones obtenidas, se realizaron cromatografías en capa fina (CCF) de fase normal (FN) y fase reversa (FR). Para ello, se utilizaron fases estacionarias recubiertas de sílica gel (Cromatofolio de sílica gel 60 F245, Merck) y diferentes sistemas de fase móvil y reveladores como: Reactivo de Productos Naturales Polietilenglicol (RPN-PEG), el cual consiste en una solución metanólica de difenilboriloxietilamina al 1 % seguida de una solución de polietilenglicol (USP, 1546580) al 5 %. Este reactivo es útil para la detección de varios fitoquímicos, especialmente flavonoides, mediante el cambio de coloración amarillo-naranja de la muestra sobre la placa. Sulfato Cérico (359009, Aldrich), se utilizó al 1 % en ácido sulfúrico (339741, Aldrich) 2N para la detección de compuestos fitoquímicos en general y el Reactivo de Komarowsky, que consiste en una solución etanólica al 50 % en ácido sulfúrico y una solución metanólica al 2 % en 4-hidroxibenzaldehído. Este revelador es universal, excepto para flavonoides. Las placas se observaron bajo luz visible y luz UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

7.4 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

El análisis químico se desarrolló utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) equipado con un módulo de separación 2996 con un detector de matriz de fotodiodos y se analizó con el software Em-power 3. La separación química se logró utilizando una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm x 250 mm de d.i., tamaño de partícula de 5 µm) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, EE. UU.). La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradiente fue el siguiente: 0–1 minuto (min), 0% B; 2–3 min, 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 14–15 min; 24–25 min, 80% B; 26–27 min, 100% B; 28–30 min, 0 % B (Tabla 4).

El caudal se mantuvo en 0,9 ml min⁻¹ y el volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. La absorbancia se midió a 330 nm. La identificación de los compuestos se realizó comparando con estándares y por sus espectros UV y tiempos de retención

Tabla 4. Sistema de separación CLAR

Tiempo en minutos	H2O grado CLAR más TFA	Acetonitrilo
1	100%	0%
4	70%	30%
20	70%	30%
21	50%	50%
22	50%	50%
23	50%	50%
24	20%	80%
25	20%	80%
26	0%	100%
27	0%	100%
28	100%	0%
30	100%	0%

Ácido trifluoroacético= TFA

7.5 Estandarización de los extractos TIHx y TIAcOEt

Después de identificar los compuestos, se tomaron datos de una curva estándar de cada cumarina con una concentración inicial de 40 µg/ml seguida de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 µg/ml (Santibáñez et al., 2023). Estas soluciones estándar se utilizaron para establecer una relación precisa entre la concentración del compuesto y el resultado obtenido en el análisis. Cada muestra fue

analizada mediante CLAR. Los cromatogramas obtenidos de estas muestras se registraron y observaron a una longitud de onda específica de 330 nm, que es adecuada para la detección de los compuestos en estudio debido a sus propiedades de absorción (Anexo 1). Para cuantificar los compuestos, se integró el área bajo la curva (ABC) de los picos obtenidos en los cromatogramas. Este proceso de integración permitió la determinación precisa de la concentración de cada compuesto en las muestras analizadas. A partir de los datos obtenidos, se generó la ecuación de la línea de calibración, representada como $y = mx + b$. Se consideró adecuado un coeficiente de determinación (R^2) en el rango de 0.99 a 1, lo que indica una alta correlación lineal entre la concentración del compuesto y la respuesta del detector.

7.6 Modelos Experimentales

7.6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones BALB/c machos de diez semanas de edad. Los animales fueron alojados en cajas y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones del bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) a temperatura constante (21–23 °C) así como condiciones de humedad (45-50%), un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a agua y alimentos estándar. Todos los experimentos siguieron las pautas de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud, y se revisaron los protocolos experimentales. Para la eutanasia de los ratones se seleccionó la técnica de sobredosis con pentobarbital sódico, la cual es aceptada por la Norma Oficial Mexicana con el número NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales). Además, el protocolo experimental fue autorizado por el Comité de Investigación en Salud local del IMSS, con número de aprobación: R-2020-1702-073.

7.6.2 Modelo de daño motor inducido por la administración de CPZ: 1) en el alimento y 2) por administración forzada.

En este estudio, se administró CPZ a ratones durante tres, cuatro y cinco semanas, utilizando dos esquemas diferentes de administración. El primero consistió en la mezcla de 0.2% de CPZ disuelta en tween 20 al 1% (como vehículo) con el alimento LabDiet 5008. Para lograr una mezcla homogénea, el alimento fue previamente molido y se mezcló con la CPZ, para formar una masa, se moldearon pellets, y posteriormente se hornearon durante 6 a 7 horas. El segundo esquema implicó la administración

oral (v.o.) de CPZ a una dosis de 40 mg/kg, disuelta en el mismo vehículo (VEH). Los animales que recibieron únicamente CPZ, sin importar la vía de administración, fueron designados como el grupo VEH. Se establecieron cinco grupos experimentales (n=30) para comparar la velocidad de inducción de daño motor en ambos modelos. Se realizaron eutanasias a 10 ratones de cada grupo al finalizar las semanas tres, cuatro y cinco (Tabla 5). Para evaluar el daño motor inducido por la CPZ, se monitorearon diariamente los parámetros de la prueba de Irwin, y se realizaron pruebas de "rota rod" (motricidad) al final de cada semana, así como la prueba de campo abierto al final de la semana tres, cuatro y cinco. Posteriormente, se administró una inyección de azul de Evans en la vena media de la cola de los animales. Tras la inyección, se procedió a realizar la eutanasia para extraer los cerebros y evaluar la integridad de la BHE.

Tabla 5. Grupos experimentales de la comparación del modelo

Grupo	Tratamiento
1 grupo sano	Ratones alimentados con dieta normal y administración de Tween 20 al 1%.
2 grupo VEH-alimento:	Ratones alimentados con CPZ al 0.2% en el alimento.
3 grupo VEH-alimento + SLM	Ratones tratados como en el grupo 2, pero con la coadministración de SLM (100 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
4 grupo VEH	Ratones tratados con administración forzada de CPZ (40 mg/kg v.o.)
5 grupo VEH + SLM	Ratones tratados como en el grupo 4, pero con la coadministración de SLM (100 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.

7.6.3 Modelo de daño motor y neuroinflamación por administración forzada de CPZ

Para evaluar los extractos y cumarinas aisladas de *T. lucida*, se indujo durante cinco semanas daño motor mediante la administración forzada de 40 mg/kg CPZ (VEH). Se establecieron once grupos experimentales (n=15) con las características descritas en la tabla 6. Todos los tratamientos se diluyeron en Tween 20 al 1% y se administraron por v.o. durante tres semanas. La evaluación del daño motor se realizó mediante:

1. Prueba de Irwin: Observada cada tercer día a partir de la primera administración.

2. Prueba de Rota rod (Rr): Realizada al final de cada semana para evaluar habilidades motoras.

3. Prueba de campo abierto (CA): Realizada al final de la semana cinco.

Tras las pruebas, se administró una inyección intravenosa de azul de Evans en la vena media de la cola a 5 ratones de cada grupo. Posteriormente, se realizó la eutanasia de los animales para extraer sus cerebros y evaluar la integridad de la BHE. En cerebros de otros animales se analizaron parámetros inflamatorios, mientras que los restantes fueron utilizados para estudios histológicos utilizando la tinción hematoxilina eosina (Figura 8).

Tabla 6. Grupos experimentales

Grupo	Tratamiento
Grupo sano	Ratones administrados con Tween 20 al 1%.
Grupo VEH	Ratones con administración forzada de CPZ (40 mg/kg v.o.)
Grupo SLM	Tratados con CPZ y coadministrados con SLM (200 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo PDN	Tratados con CPZ y coadministrados con PDN (2 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo TIHx	Tratados con CPZ y coadministrados con TIHx (25 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo TIAcOEt	Tratados con CPZ y coadministrados con el extracto TIAcOEt (25 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo IC	Tratados con CPZ y coadministrados con IC (25 mg/kg v.o.) al final de la semana 2.
Grupo HN	Tratados con CPZ y coadministrados con HN (25 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo DF	Tratados con CPZ y coadministrados con DF (25 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo SC	Tratados con CPZ y coadministrados con SC (25 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.
Grupo PE	Tratados con CPZ y coadministrados con PE (25 mg/kg v.o.) al final de la semana dos.

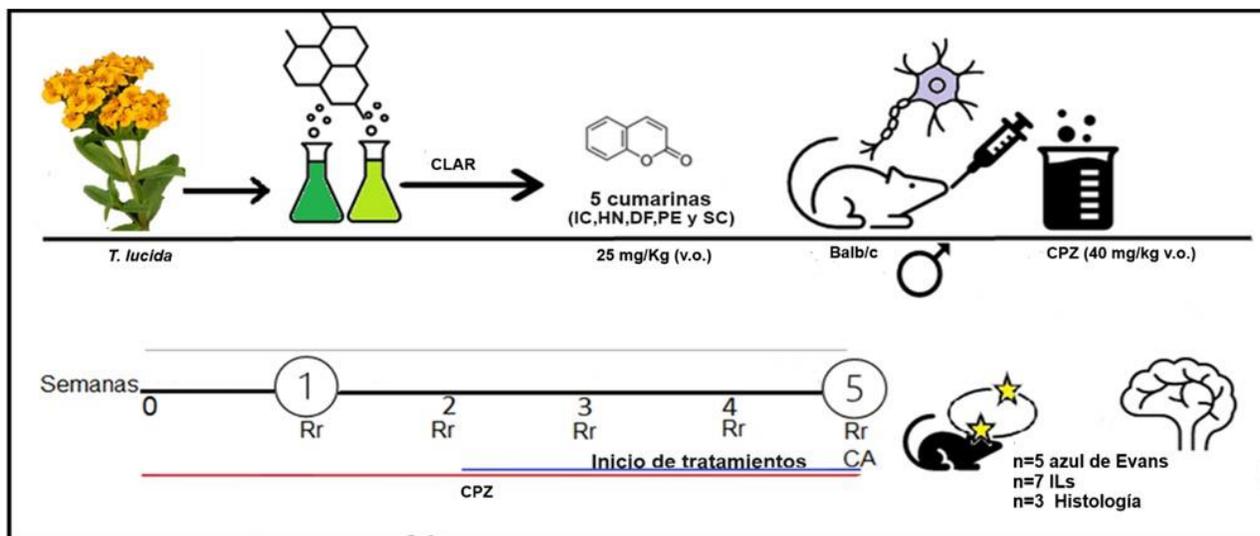


Figura 8. Diagrama general de la fase experimental: Se identificaron cinco cumarinas con actividad biológica y se indujo daño motor en ratones mediante la administración de CPZ durante cinco semanas. Al final de la segunda semana, se administraron los tratamientos correspondientes SLM, PDN, TIHx, TIACOEt, IC, HN, DF, PE y SC. Al finalizar el tratamiento, se procedió a la eutanasia de los ratones para evaluar la integridad de BHE, así como los niveles de ILs proinflamatorias y antiinflamatorias. Además, se realizó un análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

7.7 Pruebas conductuales

7.7.1 Parámetros de Irwin

La prueba de Irwin se basa en una evaluación, que consiste en realizar observaciones en cada animal para examinar sus funciones neurológicas y conductuales. (Mathiasen & Moser, 2018; Redfern *et al.*, 2019). La evaluación de esta prueba se realizó en tres tiempos: 1. Sin perturbar la jaula ni manipular al animal, 2. Durante la manipulación del animal y administración del VEH o tratamiento, 3. En los primeros 15 minutos posteriores a la administración. Cada animal de cada grupo fue evaluado por la presencia o ausencia de algún síntoma conductual o manifestación fisiológica durante tres días a la semana, los parámetros evaluados se muestran en la tabla 7 (Mathiasen & Moser, 2018).

Tabla 7. Parámetros de Irwin observados

Observaciones no perturbadas	Manejo de animales	Después de la administración
A. retorcijón B. Saltar C. Temblor D. Convulsión. E. Pelo erizado	F. Tono abdominal G. Tono de extremidades H. Pupila dilatada I. Colocación visual J. Lagrimeo K. Salivación L. Diarrea	M. Amontonamiento N. Ataxia O. Locomoción aumentada P. Sin exploración

7.7.2 Prueba de Rr

Para evaluar la motricidad y coordinación de los animales, se realizó la prueba Rr al final de cada semana. El equipo de Rr está construido de una varilla giratoria de 3 cm de diámetro que se divide en cinco pistas de 6 cm de ancho, un detector de tiempo que se detenía cuando el ratón caía sobre la pista y un software que registraba el tiempo de permanencia. Se evaluó durante 5 minutos la permanencia de cada animal en la varilla. Cada minuto, la velocidad iba aumentando, es decir al primer minuto= 4 RPM, minuto dos=12 RPM, minuto tres= 20RPM, minuto cuatro =28RPM y minuto cinco= 36 RPM. Los resultados obtenidos, se calcularon integrando el ABC de las cinco semanas experimentales.

7.7.3 Campo Abierto (CA)

Para evaluar la actividad exploratoria de los animales, se empleó la prueba del CA. Esta consistió en una caja de acrílico transparente con dimensiones de 30 x 30 x 15 cm, cuyo piso negro estaba dividido en nueve cuadrados iguales. Durante la evaluación, cada ratón fue colocado en el centro de la caja, y su comportamiento fue monitoreado y grabado en video bajo luz roja durante un periodo de 5 minutos. Los parámetros analizados incluyeron el número de veces que el animal cruzó los cuadrantes utilizando las cuatro patas. Estos cruces se clasificaron según la ubicación dentro de la caja: cruces totales (CT), que engloban todos los movimientos en cualquier dirección; cruces a la periferia (CP), refiriéndose a los movimientos hacia los bordes de la caja; y cruces al centro (CC), que son los movimientos hacia la zona central. Además, se observaron otros comportamientos como elevamientos

verticales (EV), que indican la exploración en dos patas; acicalamientos que reflejan comportamientos de limpieza; y la producción de heces (H), como indicadores de estrés o ansiedad.

7.8 Tinción por azul de Evans

Se evaluó el aumento de la permeabilidad vascular mediante la inyección intravenosa de azul de Evans (AE). Se preparó una solución estéril de AE al 0,5% en PBS (la solución se esterilizó por filtración para eliminar cualquier partícula no disuelta). Se tomaron 200 μ L de solución de AE en una jeringa de 1 ml. Los ratones se colocaron en un dispositivo de restricción para que no se muevan libremente, pero se pueda manipular su cola. Se insertó la aguja (calibre pequeño, 30G X 13 mm) en un ángulo de 10-15 grados, con cuidado de no hacer contrapresión. Para una colocación adecuada, se inyectaron lentamente 200 μ l de solución de AE en la vena de la cola del ratón. Se devolvió al ratón a su jaula observándolo durante 1 hora. Posteriormente, se hizo eutanasia en los ratones utilizando pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg, administrado por vía intraperitoneal como anestésico. Se realizó la apertura de la cavidad craneal y se extrajo el cerebro en su totalidad. Posteriormente, cada cerebro se colocó en tubos de 1.5 ml, a los cuales se les añadieron 500 μ l de formamida por muestra. Todos los tubos se colocaron en un baño de agua a 55 °C y se incubaron durante 24 horas para extraer el AE del tejido. Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron (10 min, a 14.000 RPM) para sedimentar los fragmentos de tejido restantes. La absorbancia se midió a 630 nm, utilizando 500 μ l de formamida como blanco. Los datos se calcularon usando el coeficiente de extinción de AE $\epsilon=7.81e4$ (Goldim et al., 2019; Honeycutt & O'Brien, 2020).

7.9 Cuantificación de IL-1 β , IL-4, IL-10 y TNF- α en cerebro por ELISA

Al término de la quinta semana, los ratones fueron sacrificados utilizando pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg, administrado por vía intraperitoneal como anestésico., se abrió la cavidad craneal y se retiró el cerebro completo. Los cerebros fueron homogenizados con PBS-PMSF (0,1%) 1:5 p/v. Las suspensiones se centrifugaron a 14.000 RPM durante 7 min y los sobrenadantes se utilizaron para determinar la concentración de ILs mediante ELISA (Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los kits ELISA de IL-1 β , IL-4, IL-10 y TNF α de ratón se adquirieron en OptEIA™ BD. Brevemente, se recubrieron placas ELISA de fondo grueso de 96 pocillos con el anticuerpo de captura respectivo y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los sitios

de unión no específicos se bloquearon incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBS-Albumina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) al 10%. A continuación, se añadió la muestra y se incubó durante 2h a temperatura ambiente. Luego, las placas se incubaron con los correspondientes anticuerpos de detección anti-citocina-HRP durante 30 min a temperatura ambiente. Los complejos unidos se detectaron mediante reacción con sustrato de tetrametilbencidina después de 30 minutos de incubación en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y se midió la absorbancia a 490 nm a 37 °C en un lector de placas VERSAmax ELISA (Molecular Devices). La concentración de ILs se calculó según las curvas estándar para cada citocina y se reportó como pg/mg de proteína.

7.10 Obtención y fijación de órganos para pruebas histológicas

Al término de la quinta semana, los animales fueron anestesiados con 60 mg/Kg de pentobarbital sódico, administrado por vía intraperitoneal. Posteriormente se procedió a la perfusión intracardiaca con formalina al 4%. Después de la perfusión, se abrió la cavidad craneal y se retiró el cerebro. Los cerebros extraídos se colocaron en formalina al 10% a temperatura ambiente para una completa fijación y posterior uso.

7.10.1 Obtención de cortes histológicos de cerebro

Se realizó un corte longitudinal en cerebros previamente fijados en formalina al 10%. Los tejidos se sumergieron en agua por 30 minutos para prepararlos para la deshidratación. Este proceso incluyó una serie de baños de alcohol con concentraciones crecientes (70%, 80%, 90% y 100%), donde cada etapa duró 30 minutos. Posteriormente, se procedió al aclaramiento de las muestras sumergiéndolas en una mezcla de alcohol al 100% y xilol en una proporción de 50/50, seguido de dos inmersiones en xilol puro, cada una por una hora, renovando el xilol después de cada inmersión. Este paso es esencial para eliminar cualquier residuo de alcohol y preparar el tejido para la inclusión en parafina. Tras el aclaramiento, los cerebros se colocaron en parafina líquida a 60°C, en dos etapas de una hora cada una, con un cambio de parafina entre ambas para asegurar una penetración completa de la parafina en el tejido, facilitando así el corte posterior. Para la inclusión en parafina, los tejidos se dispusieron en moldes con parafina líquida y se dejaron solidificar a temperatura ambiente, formando bloques de parafina. Finalmente, se cortaron secciones del tejido de 5 µm de grosor utilizando un microtomo

(KD2258). Los cortes se recogieron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma) para garantizar su adherencia.

7.10.2 Tinción hematoxilina y eosina en hipocampo

Para el estudio histopatológico del hipocampo, los cortes de tejido montados en portaobjetos se desparafinaron inicialmente con xilol, sometiéndolos a dos inmersiones de 10 minutos cada una para eliminar completamente la parafina. Posteriormente, se rehidrató el tejido pasándolo por una serie de soluciones alcohólicas de concentraciones decrecientes: 100%, 96%, 90% y agua durante 2 a 3 minutos en cada solución.

Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E): La tinción H&E es una de las técnicas de coloración más utilizadas en el área de histología y citología. Se utiliza para visualizar células, fibras nerviosas gruesas y la presencia de ciertos microorganismos en los tejidos. En este sentido, la hematoxilina (H) se considera un colorante básico y por ello tiene afinidad por las estructuras ácidas, como el núcleo de las células. Mientras que la eosina (E), al ser un colorante ácido, tiene afinidad por las estructuras alcalinas o básicas, como el citoplasma celular. Por esta razón, esta combinación de colorantes es muy utilizada para la tinción de tejidos, pues permite distinguir claramente los núcleos y los citoplasmas. Los núcleos se tiñen de color azul oscuro o púrpura y el citoplasma de rosado.

Procedimiento de tinción.

1. Las láminas se lavaron con agua destilada durante 1 minuto para eliminar cualquier residuo.
2. Posteriormente, se sumergieron en hematoxilina durante 3-5 minutos para la tinción nuclear.
3. Una vez finalizado este tiempo, se enjuagaron las láminas con agua durante 1 minuto.
4. Se diferenciaron en alcohol ácido (1% HCl en 70% etanol), empleando la técnica de inmersión rápida (entrada y salida).
5. Luego, se enjuagaron con agua y se sumergieron brevemente en solución de amoníaco para azular el tejido, utilizando también la técnica de inmersión rápida.
6. A continuación, las láminas se enjuagaron nuevamente con agua y se tiñeron con eosina durante 1-2 minutos para destacar las estructuras citoplasmáticas.
7. Se realizó un breve enjuague con agua corriente.
8. Las láminas se deshidrataron pasándolas por una serie de soluciones alcohólicas de concentraciones ascendentes (96% y dos veces 100%), durante 1 minuto en cada solución.
9. Finalmente, se aclararon dos veces en xilol durante 5 minutos cada una y se enjuagaron con

agua antes de dejar secar.

10. Se aplicó una gota de resina sobre cada muestra antes de colocar el cubreobjetos, y las preparaciones fueron examinadas bajo un microscopio óptico a aumentos de 10X y 40X.

(Cardiff et al., 2014).

7.11 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando InStat (*GraphPad*, San Diego, CA, EE. UU.) y expresados como media \pm DE. Se utilizó ANOVA de una vía para comparar grupos o tratamientos con una prueba de *Tukey*, la prueba de *Dunnet*, *t de Student* y la prueba de Chi-cuadrado de Excel se utilizó para los resultados de comportamiento en la prueba de Irwin. Las diferencias se consideraron significativas cuando $*p < 0.05$, en comparación con el grupo VEH, para todos los ensayos.

8 RESULTADOS

8.1 Perfil químico del TIHx y TIAcOEt

Para investigar el perfil químico de los extractos TIHx y TIAcOEt, se empleó la técnica de CLAR y se realizaron CCF para cada fracción obtenida. Estas fracciones se compararon con un extracto de referencia y estándares, aunque los resultados de las CCF no se presentan aquí. La Figura 9 (a) muestra un cromatograma que compara ambos extractos a una longitud de onda de 330 nm. En el análisis se identificaron cinco cumarinas, caracterizadas por sus tiempos de retención y espectros UV. Estas incluyen: 7-Isopreniloxicumarina (IC) con un tiempo de retención (TR) de 27.29 min ($\lambda = 201.7, 322.0$ nm), herniarina (HN) con un TR de 12.25 min ($\lambda = 216.9, 322.0$ nm), dimetilfraxetina (DF) con un TR de 11.75 min ($\lambda = 211.0, 294.7, 338.6$ nm), escoporona (SC) con un TR de 10.37 min ($\lambda = 229.8, 297.0, 343.4$ nm), y 7-O-prenil-escopoletina (PE) con un TR de 9.54 min ($\lambda = 215.7, 324.4$ nm). La Figura 9 (b) presenta la estructura química de las cumarinas identificadas. Entre ellas, la IC y la HN poseen estructuras relativamente simples, caracterizadas por una única sustitución en la posición 7 del anillo bencénico (monosustituidas). La HN incorpora un grupo metoxi, mientras que la IC está incorporada un sustituyente isoprenilo, específicamente un 2-metil-1,3-butadieno. Por otro lado, las cumarinas SC y PE son ejemplos de disustituidas, con modificaciones en los carbonos 6 y 7 del anillo. La SC tiene grupos metoxi en ambas posiciones (disustitución simple), en contraste con la PE que combina un grupo metoxi en la posición 6 y un isoprenilo en la 7, constituyendo una disustitución más compleja. Finalmente, la DF es una cumarina trisustituida, con tres grupos metoxi ubicados en los carbonos 5, 6 y 7. La identificación de estos compuestos se confirmó mediante la comparación de los datos espectrales de TR y UV reportados en la literatura científica (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020).

8.1.1 Estandarización de los extractos TIHx y TIAcOEt

Para la cuantificación de cumarinas presentes en cada extracto, se utilizaron los datos obtenidos de las curvas estándar de cada compuesto analizado por CLAR (Anexo 1). Las concentraciones de las cumarinas, expresadas en microgramos por miligramo de extracto ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto), se presentan en la Tabla 8. De acuerdo con la Figura 9 (a), se observa una variabilidad en el tamaño de los picos cromatográficos para cada compuesto entre los extractos, lo que refleja diferencias en las concentraciones. Específicamente, la IC mostró una mayor concentración en el extracto menos polar (TIHx), mientras que las otras cumarinas (HN, DF, SC y PE), se encontraron en concentraciones más

elevadas en el extracto de mediana polaridad (TIAcOEt). Notablemente, SC fue identificada como la cumarina con mayor concentración en ambos extractos.

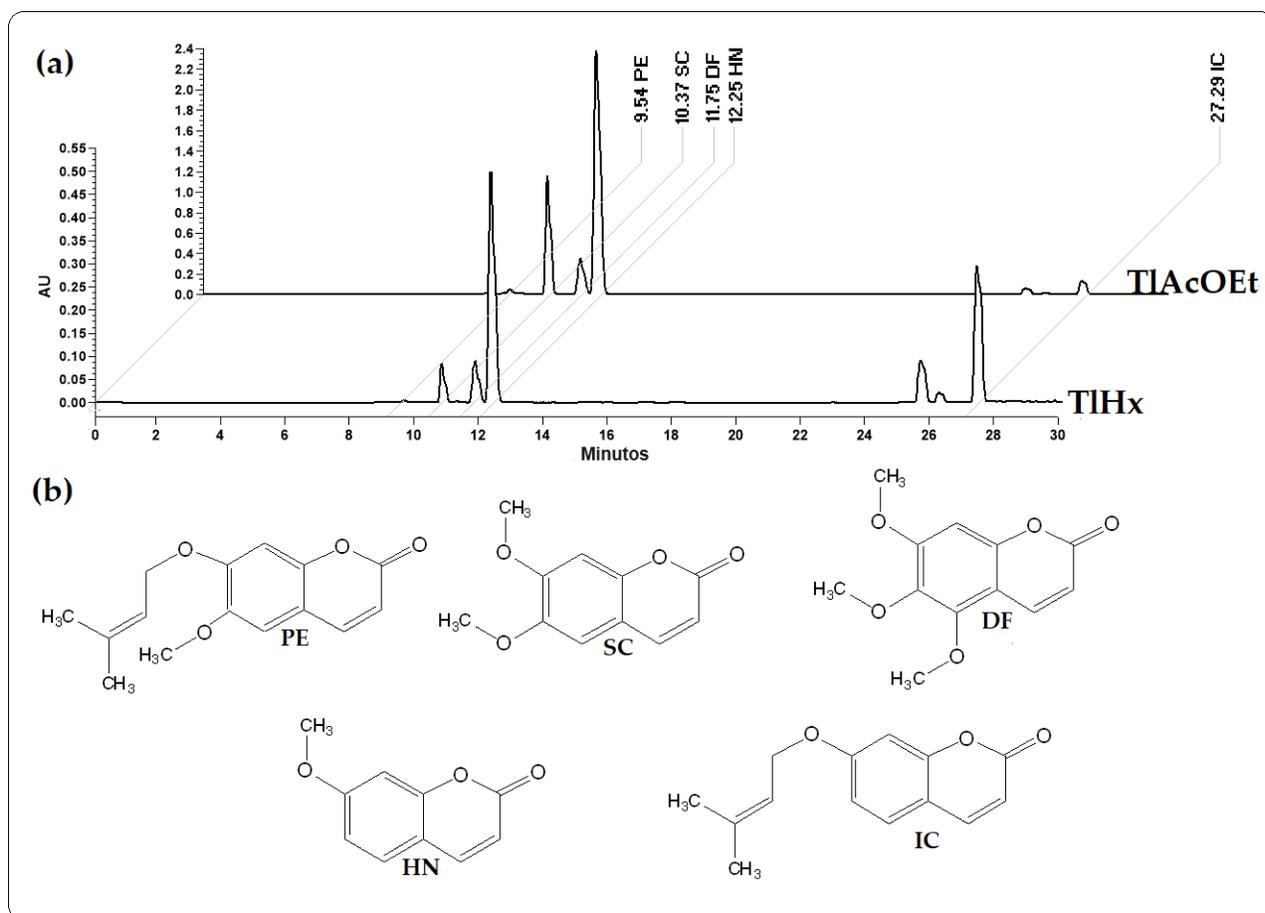


Figura 9. Comparación de cromatogramas por CLAR: a) TR de los extractos TIHx y TIAcOEt a 330 nm, b) estructura química de: 7-O-Prenilescopoletina (PE), Escoporona (SC), Dimetilfraxetina (DF), Herniarina (HN), 7-Isopreniloxicumarina (IC).

Tabla 8. Concentración de cumarinas de *T. lucida*.

Extracto	PE [µg/mg]	SC [µg/mg]	DF [µg/mg]	HN [µg/mg]	IC [µg/mg]
TIHx	0.1	15528.4	19.9	79.9	40.1
TIAcOEt	3.05	230692.7	75.3	381.9	18.1

7-O-Prenilescopoletina (PE), Escoporona (SC), Dimetilfraxetina (DF), Herniarina (HN), 7-Isopreniloxicumarina (IC).

8.2 Efecto de CPZ sobre parámetros conductuales en ratones

8.2.1 Prueba de Irwin.

En el grupo de animales sanos, no mostraron signos de piloerección ni amontonamiento durante el periodo de evaluación de cinco semanas o algún otro signo de daño en su comportamiento, bajo el esquema de observación de Irwin. En el grupo VEH-alimento, no se detectó piloerección durante las primeras dos semanas; sin embargo, a partir de la tercera semana, el 100% de los animales experimentó piloerección, la cual persistió hasta la quinta semana. El grupo que fue tratado con SLM (SLM-alimento) mostró un incremento progresivo en la incidencia de piloerección, comenzando con el 66.6% de los animales afectados en la tercera semana y alcanzando el 100% en la quinta semana. Respecto al comportamiento de amontonamiento, se observó desde la primera semana en ambos grupos tratados solo con VEH. En el grupo VEH-alimento, la prevalencia de amontonamiento inició en un 13.3% y escaló hasta el 100% hacia el final del estudio. En contraste, el grupo SLM-alimento inició con un 23.3% de los animales exhibiendo amontonamiento, alcanzando un 70% al final de la quinta semana. En el modelo de administración forzada, ambos grupos, VEH y SLM, mostraron un 100% de incidencia de piloerección desde la cuarta semana hasta el final del periodo de observación. El amontonamiento también fue prominente, observándose en el 100% de los animales en el grupo VEH durante todas las semanas, mientras que el tratamiento con SLM redujo este parámetro al 30% en la quinta semana (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de los efectos de la CPZ por parámetros de Irwin

Semana	Tratamientos (mg/kg)	% Piloerección	% amontonamiento	Tratamientos (mg/kg)	% Piloerección	% amontonamiento
1	Sano	N/O	N/O	Sano	N/O	N/O
	VEH-alimento	N/O	13.3	VEH	N/O	100
	SLM-Alimento	N/O	23.3	SLM	N/O	100
2	Sano	N/O	N/O	Sano	N/O	N/O
	VEH-alimento	N/O	83.3	VEH	N/O	100
	SLM-Alimento	N/O	90	SLM	N/O	100
3	Sano	N/O	N/O	Sano	N/O	N/O
	VEH-alimento	100	100	VEH	N/O	100
	SLM-alimento	66.6	90	SLM	N/O	100
4	Sano	N/O	N/O	Sano	N/O	N/O
	VEH-alimento	100	100	VEH	100	100
	SLM-alimento	75	50	SLM	100	35
5	Sano	N/O	N/O	Sano	N/O	N/O
	VEH-alimento	100	100	VEH	100	100
	SLM-alimento	100	70	SLM	100	30

Sano: Tween 20 al 1% (utilizado para disolver tratamientos y CPZ), VEH-alimento: (CPZ al 0.2%), VEH: CPZ a 40 mg/kg, silimarina (SLM a 100 mg/kg), N/O = No observado.

8.2.2 Efecto de CPZ sobre la motricidad y coordinación motora en ratones.

Se utilizó la prueba de Rr para evaluar la motricidad y coordinación en ratones. La Figura 10 muestra el tiempo, en segundos, que los ratones lograron mantenerse en la Rr a una velocidad de 36 RPM durante las semanas tres, cuatro y cinco. Para otras velocidades (4, 12, 20 y 28 RPM), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de permanencia entre los grupos (datos no mostrados). Los resultados específicos del modelo VEH-alimento se muestran en los incisos a, b y c. En las semanas cuatro y cinco, solo el grupo sano mostro un incremento significativo en el tiempo de permanencia en el Rr en comparación con el grupo VEH-alimento ($*p < 0.05$). En la semana 5, el grupo SLM-alimento también exhibió un aumento significativo comparado al grupo VEH-alimento ($*p < 0.05$). Los incisos d, e y f presentan los resultados del modelo VEH (40 mg/kg). Durante las

semanas cuatro y cinco, tanto el grupo sano como el grupo SLM alcanzaron tiempos de permanencia significativamente mayores en la prueba de la Rr en comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$).

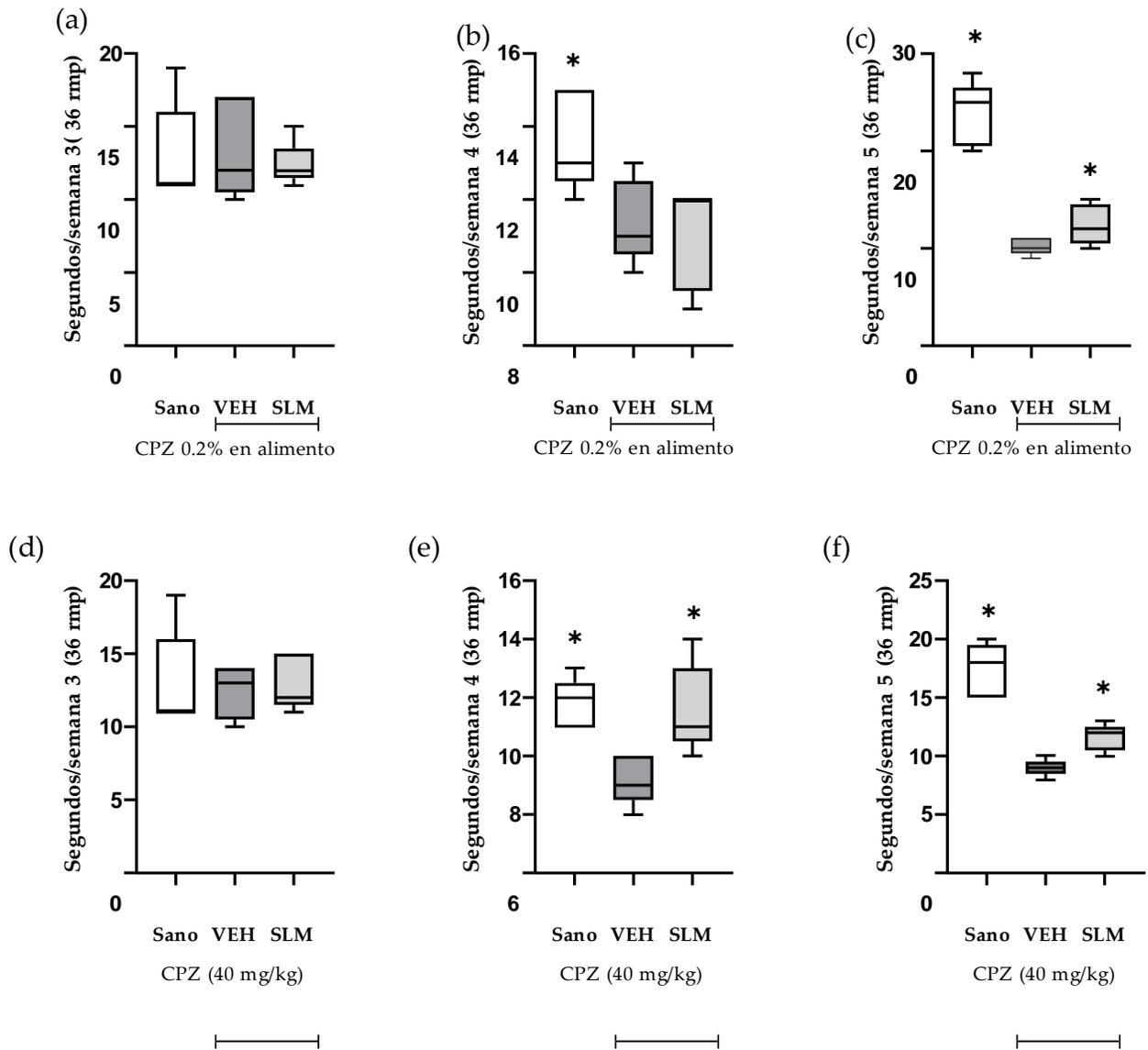


Figura 10. Tiempo de permanencia en la prueba de Rr a una velocidad de 36 rpm en ratones alimentados y tratados con CPZ durante tres, cuatro y cinco semanas. En los incisos a, b y c, se muestran los resultados de ratones alimentados con una dieta que contenía 0.2% de CPZ durante tres, cuatro y cinco semanas, respectivamente. Los incisos d, e y f presentan los resultados de ratones tratados con CPZ a una dosis de 40 mg/kg, administrada por vía oral forzada durante tres, cuatro y cinco semanas, respectivamente, la SLM se administró a una dosis de 100 mg/kg. Los datos muestran media \pm DE, con $n=10$, $*p < 0,05$, indica diferencias significativas entre los grupos en comparación con el grupo VEH, mediante el uso de ANOVA con una *post-test* Tukey.

8.2.3 Efecto de CPZ sobre la locomoción y otras conductas en CA

Las evaluaciones del CA para el modelo VEH-alimento se presentan en la Tabla 10, y se destacan los siguientes resultados: En la semana tres el grupo sano mostró más CT y CP, junto a una disminución significativa del número de acicalamientos en comparación con el grupo VEH-alimento ($*p < 0.05$). Mientras que SLM-alimento solo mostró un aumento significativo en el número de EV en comparación con el VEH-alimento ($*p < 0.05$). En la semana 4 el grupo sano y SLM-alimento presentaron menor número de actividades relacionadas con la ansiedad en comparación con el VEH-alimento ($*p < 0.05$). Además, el grupo sano presentó más EV que el VEH-alimento ($*p < 0.05$). En la semana cinco el grupo sano mostró diferencias significativas respecto al VEH-alimento en términos de aumentos en CT, CP y EV, y una disminución en acicalamientos ($*p < 0.05$). El grupo SLM-alimento mostró una disminución en acicalamientos y un aumento en EV en comparación con el VEH-alimento ($*p < 0.05$). La Tabla 11 muestra los resultados de la CA para el modelo VEH por administración forzada: En la semana tres, cuatro y cinco el grupo sano presentó aumentos significativos en CT, CP y EV en comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$) y solo en la semana cinco, disminución de acicalamientos comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$). SLM mostró un aumento en EV en las semanas tres, cuatro y cinco en comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$). En la semana cinco, también mostró aumentos en CT y CP, así como disminución de acicalamientos en comparación con el VEH ($*p < 0.05$). En cuanto a los CC y H, no se observaron diferencias significativas en las semanas de comparación entre los grupos (VEH = $p > 0.05$).

Tabla 10. CA de CPZ en 0.2% de alimento.

Semana	Tratamientos	CT (número)	CP (número)	CC (número)	Acicalamiento ((número)	EV (número)	H (número)
3	Sano	47.5 ± 7.3*	44.5 ± 6.9*	3.0 ± 1.2	5.0 ± 2.1*	3.0 ± 1.6*	2.2 ± 1.1
	VEH	38.1 ± 3.7	35.6 ± 3.3	1.8 ± 0.9	7.2 ± 2.4	2.4 ± 1.1	2.0 ± 1.0
	SLM	37.1 ± 4.2	34.8 ± 4.0	2.3 ± 1.1	7.0 ± 2.5	3.7 ± 1.0*	2.8 ± 1.0
4	Sano	44.0 ± 6.9	41.5 ± 7.2	2.6 ± 1.5	6.5 ± 1.4*	4.2 ± 1.0*	2.9 ± 1.0
	VEH	38.1 ± 2.6	36.8 ± 2.8	1.6 ± 0.5	9.0 ± 1.6	2.2 ± 1.2	2.8 ± 1.2
	SLM	44.0 ± 4.6	41.3 ± 3.8	3.0 ± 1.4	6.7 ± 2.4*	2.2 ± 0.9	2.6 ± 1.1
5	Sano	45.6 ± 10.7*	43.2 ± 9.5*	2.4 ± 1.8	6.4 ± 2.3*	4.0 ± 1.2*	1.5 ± 0.5
	VEH	31.0 ± 2.1	27.5 ± 2.6	3.5 ± 1.9	10.6 ± 2.3	2.0 ± 1.0	1.3 ± 1.0
	SLM	39.7 ± 2.5	37.5 ± 2.5	2.2 ± 0.5	7.2 ± 1.7*	4.1 ± 1.2*	1.6 ± 0.5

CA en ratones BALB/c alimentados con CPZ al 0.2% en la semana; tres, cuatro y cinco. (CT) Número de cruces totales, (CP) Número de cruces a la periferia, (CC) Número de cruces al centro, Número de acicalamientos, (EV) Número de elevamientos verticales, (H) Número de heces. Los datos se analizaron con ANOVA con una *post-test* Dunnett (media ± DE), y la diferencia es estableció cuando **p* <0,05 en comparación con el grupo VEH. Sano: Tween 20 al 1% (utilizado para disolver tratamientos y CPZ), VEH: (CPZ al 0.2%), SLM a 100 mg/kg.

Tabla 11. CA de CPZ por administración forzada.

Semana	Tratamientos	CT (número)	CP (número)	CC (número)	Acicalamiento ((número)	EV (número)	H (número)
3	Sano	47.5 ± 7.3*	44.5 ± 6.9*	3.0 ± 1.2	5.0 ± 2.1	3.0 ± 1.6*	2.2 ± 1.1
	VEH	36.0 ± 3.6	34.2 ± 3.9	1.7 ± 1.2	5.3 ± 2.2	1.5 ± 1.5	2.2 ± 1.0
	SLM	29.7 ± 6.4	28.3 ± 6.5	1.3 ± 0.8	5.6 ± 2.0	4.0 ± 1.7*	2.8 ± 1.0
4	Sano	44.0 ± 6.9*	41.5 ± 7.2*	2.6 ± 1.5	6.5 ± 1.4	4.2 ± 1.0*	1.9 ± 1.0
	VEH	28.4 ± 6.9	26.4 ± 6.9	2.0 ± 1.5	5.9 ± 2.5	2.3 ± 1.2	2.9 ± 1.1
	SLM	31.7 ± 9.6	29.2 ± 9.0	2.8 ± 1.4	7.4 ± 2.5	4.7 ± 1.0*	2.6 ± 1.1
5	Sano	45.6 ± 10.7*	43.2 ± 9.5*	2.4 ± 1.8	6.4 ± 2.3*	4.0 ± 1.2*	1.5 ± 0.5
	VEH	27.8 ± 10.6	26.2 ± 10.0	1.0 ± 0.7	11.8 ± 1.4	1.2 ± 0.8	1.5 ± 1.0
	SLM	46.8 ± 6.2*	42.2 ± 5.3*	2.8 ± 1.3	5.6 ± 2.6*	2.6 ± 1.6*	1.7 ± 0.5

CA en ratones BALB/c administrados con CPZ (40mg/Kg), en la semana; tres, cuatro y cinco. (CT) Número de cruces totales, (CP) Número de cruces a la periferia, (CC) Número de cruces al centro, Número de acicalamientos, (EV) Número de elevamientos verticales, (H) Número de heces Los datos se analizaron con ANOVA con una *post-test* Dunnett (media ± DE), y la diferencia es estableció cuando **p* <0,05 en comparación con el grupo VEH. Sano: Tween 20 al 1% (utilizado para disolver tratamientos y CPZ), SLM a 100 mg/kg.

8.3 Efecto de CPZ sobre la permeabilidad de la BHE.

La evaluación de la prueba de permeabilidad vascular *in vivo*, mediante la inyección intravenosa de AE, se presentan en la Figura 11. En los incisos a, b y c, se muestran los resultados del diseño VEH-alimento y se observa que durante las semanas tres, cuatro y cinco, el grupo sano mostró diferencias significativas respecto al grupo VEH-alimento ($*p < 0.05$). El grupo VEH-alimento presentó un aumento en la permeabilidad de la BHE durante estas semanas, mientras que el tratamiento farmacológico (SLM-alimento) mostró una diferencia significativa en la semana cinco al reducir la extravasación del colorante en comparación con el grupo VEH-alimento ($*p < 0.05$). En los incisos d, e y f de la misma figura, se presentan los datos del diseño de administración forzada. En este caso, se observó que en la semana cuatro y cinco, el grupo sano fue significativamente diferente al grupo VEH ($*p < 0.05$), mientras que el grupo SLM no mostró diferencias significativas respecto al grupo VEH en ninguna semana ($p > 0.05$).

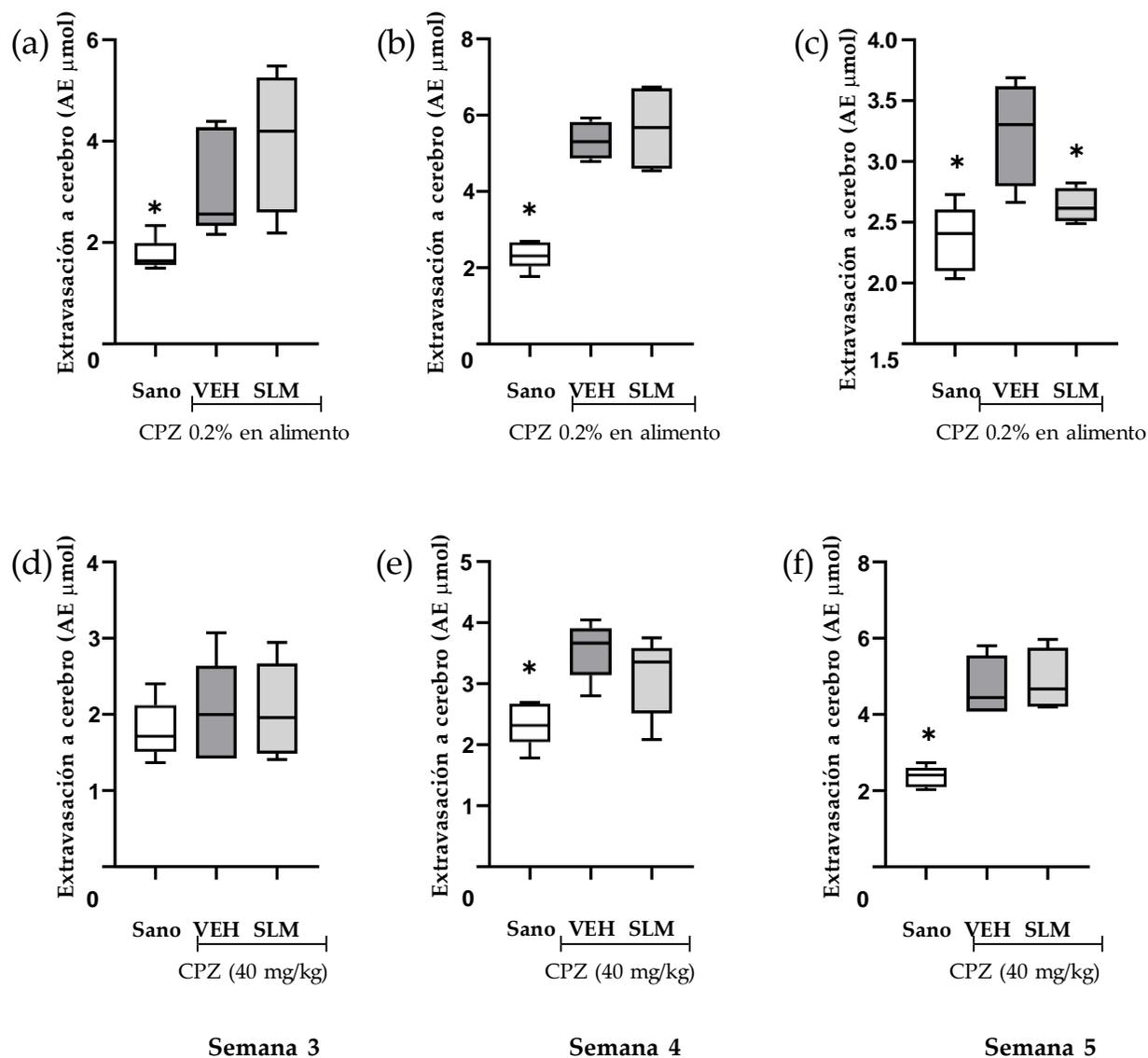


Figura 11. Efecto de la CPZ sobre la permeabilidad de la BHE: La densidad óptica se midió a 630 nm y las mediciones se convirtieron en μmol de colorante extravasado, utilizamos el coeficiente de extinción $AE \epsilon = 7,81 \times 10^4$. En el inciso: a, b y c, se presentan cerebros de ratones alimentados con una dieta que contenía 0.2% de CPZ durante tres, cuatro y cinco semanas, respectivamente. En el inciso: d, e y f presentamos cerebros de ratones administrados con CPZ a una dosis de 40 mg/kg, administrada por vía oral forzada durante tres, cuatro y cinco semanas, respectivamente, la SLM se administró a una dosis de 100 mg/kg y el grupo sano solo recibió Tween 20 al 1% (utilizado para disolver tratamientos y CPZ). Los datos muestran media \pm DE, con $n=5$, $*p < 0,05$, lo que indica diferencias significativas de los grupos cuando se comparan con el VEH, mediante el uso de ANOVA con un *post-test* Dunnett.

8.4 Efecto de dos extractos estandarizados y cinco cumarinas de *T. lucida* sobre el daño motor inducido por CPZ.

8.4.1 Parámetros de Irwin

La Tabla 12 presenta el porcentaje de ratones que presentaron piloerección en cada grupo. Durante la primera semana de administración de CPZ, no se observaron cambios en ninguno de los grupos. A partir de la segunda semana, el 20% de los ratones en el grupo VEH mostró esta respuesta, aumentando progresivamente hasta alcanzar el 93.3% en la cuarta y quinta semanas. Al comparar los grupos con el grupo VEH, se observó que el grupo tratado con SLM también presentó un incremento en la piloerección, aunque a un ritmo más lento, alcanzando solo el 60% al final del estudio. En contraste, el grupo PDN mostró un porcentaje menor, con solo un 26% de ratones afectados en la quinta semana. Los grupos tratados con TIHx y TIACOEt presentaron un 20% de piloerección en la quinta semana, similar al nivel inicial observado en VEH. La administración de las cumarinas proporcionó una protección notable en comparación con VEH. En particular, el grupo PE no mostró piloerección en la segunda semana, alcanzando un 40% en la tercera semana, pero con una marcada disminución al 6% en la quinta semana, un valor comparable al del grupo SC en el mismo periodo.

Por otro lado, la Tabla 13 muestra los resultados del parámetro de amontonamiento en la prueba de Irwin. Desde la primera semana, este comportamiento fue evidente en todos los grupos, excepto en el grupo sano. En el grupo VEH, el porcentaje de animales con esta conducta aumentó gradualmente hasta alcanzar el 100% en la quinta semana. En contraste, los grupos tratados con SLM y PDN lograron prevenir un aumento de esta conducta, con solo un 20% de los animales mostrando este comportamiento al final del estudio. Todos los grupos tratados con *T. lucida* redujeron este parámetro en comparación con el grupo VEH. En particular, los grupos TIACOEt, PE y DF evitaron completamente la aparición de este comportamiento en sus respectivos grupos durante la quinta semana.

Tabla 12. Porcentaje de ratones en los que se observó piloerección durante la prueba de Irwin.

Semanas	Sano	VEH	SLM	PDN	TIHx	TIACoEt	HN	SC	DF	IC	PE
CUPRIZONA											
1	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O
2	N/O	20%	13.30%	15%	26.60%	20%	20%	26.60%	6.60%	13.30%	N/O
3	N/O	53.30%	40%	37%	26.60%	46.60%	33.30%	20%	26.60%	33.30%	40%
4	N/O	93.30%	73.30%	40%	26.60%	33.30%	26.60%	13.30%	13.30%	40%	33.30%
5	N/O	93.30%	60%	26%	20%	20%	20%	6.60%	20%	13.30%	6.60%

Vehículo (VEH), silimarina, (SLM), Prednisona (PDN), herniarina (HN), escoporona (SC), dimetilfraxetina (DF), 7-Isopreniloxicumarina (IC), 7-O-prenilescopoletina (PE), N/O = no observado. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIACoEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

Tabla 13. Porcentaje de ratones en los que se observó amontonamiento durante la prueba de Irwin.

Semanas	Sano	VEH	SLM	PDN	TIHx	TIACoEt	HN	SC	DF	IC	PE
CUPRIZONA											
1	N/O	26.60%	33.30%	20%	20%	13.30%	33.30%	20%	26.60%	40%	13.30%
2	N/O	33.30%	33.30%	37%	26.60%	26.60%	46.60%	40%	40%	46.60%	60%
3	N/O	86.60%	53.30%	40%	26.60%	40%	40%	33.30%	33.30%	33.30%	53.30%
4	N/O	86.60%	33.30%	28%	20%	33.30%	26.60%	20%	20%	26.60%	40%
5	N/O	100%	20%	20%	13.30%	N/O	13.30%	13.30%	N/O	13.30%	N/O

Vehículo (VEH), silimarina, (SLM), Prednisona (PDN), herniarina (HN), escoporona (SC), dimetilfraxetina (DF), 7-Isopreniloxicumarina (IC), 7-O-prenilescopoletina (PE), N/O = no observado. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIACoEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

8.4.2 Prueba de Rr

La Figura 12 muestra el ABC sobre el parámetro de tiempo de permanencia de los ratones en la prueba de Rr durante las cinco semanas experimentales. Los animales fueron evaluados a 4, 12, 20, 28 y 36 rpm. Los datos a 4 y 12 rpm no mostraron cambios significativos en comparación con el grupo VEH (datos no mostrados, VEH, $p > 0.05$). El deterioro de la coordinación motora provocado por la CPZ se evidenció a partir de 20 rpm, continuando hasta 28 y 36 rpm, con diferencias significativas entre el grupo sano y el grupo VEH ($*p < 0.05$) (Figuras 12a, 12b y 12c. Sin embargo, como se muestra en la Figura 12, los grupos de animales tratados con SLM, PDN, TIHx, TIAcOEt y las cinco cumarinas modificaron este comportamiento, siendo estadísticamente diferentes del grupo VEH ($*p < 0.05$), excepto SLM a 36 rpm, que no presentó diferencias significativas en comparación con el VEH.

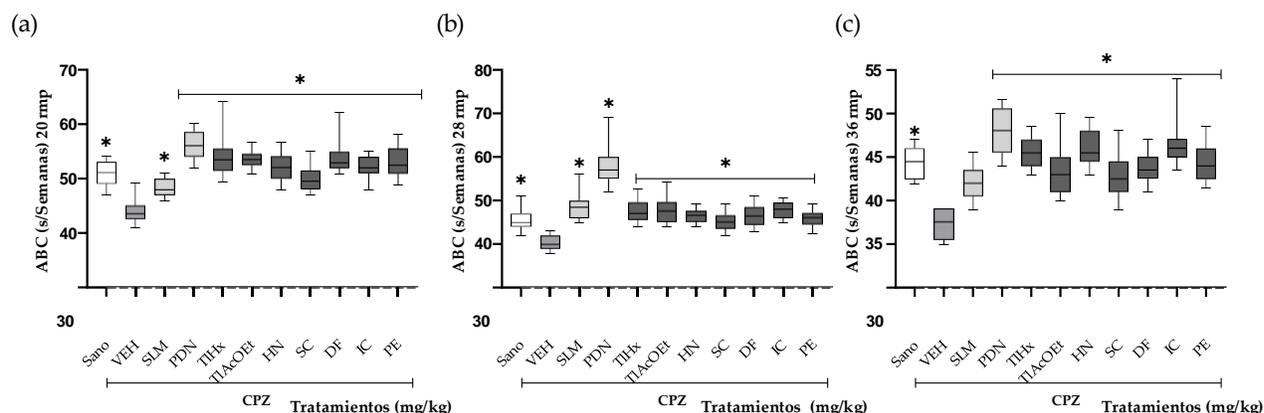


Figura 12. Efecto de *T. lucida* en la coordinación motora: Ratones BALB/c administrados con CPZ durante cinco semanas y expuestos a la prueba Rr. Tres velocidades diferentes: (a) 20 rpm, (b) 28 rpm y (c) 36 rpm. Los datos muestran la media \pm DE $*p < 0,05$, indica diferencias significativas entre los grupos en comparación con el grupo VEH, mediante el uso de ANOVA con un *post-test* Tukey. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIAcOEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

8.4.3 Prueba de CA

Los resultados de la prueba de CA mostraron que la administración de CPZ provocó cambios significativos en el comportamiento de los ratones en varios parámetros del CA, comparado con un grupo de animales sanos ($*p < 0.05$). En la Figura 13 se muestran los parámetros evaluados. El grupo VEH mostro un aumento significativo en: CT (Figura 13a), en CP (Figura 13c), en acicalamientos, (Figura 13d), en EV (Figura 13e), en H (Figura 13f) y una disminución en CC (Figura 13b). En comparación con el grupo VEH, los tratamientos con fármacos (SLM y PDN) y extractos de *T. lucida* disminuyeron significativamente el número de CT (excepto DF y HN) y aumentaron el número de CC (excepto PE, que no mostró diferencias significativas en este parámetro). En cuanto a los CP, los fármacos estándar, los extractos TIHx y TIAcOEt, y las cumarinas IC y PE redujeron significativamente el número de eventos provocados por la CPZ ($*p < 0.05$, figura 13c). Los ratones tratados con HN, DF y SC no modificaron este comportamiento. Los parámetros asociados con la emocionalidad de los ratones también se vieron afectados en comparación con el grupo VEH, los acicalamientos disminuyeron significativamente con SLM, TIHx, TIAcOEt y SC ($*p < 0.05$, figura 13d). Los EV disminuyeron en los grupos tratados con SLM, PDN, TIHx, TIAcOEt, DF, PE y HN ($*p < 0.05$, figura 13e) y el número de heces disminuyó en los grupos tratados con PDN, TIHx, TIAcOEt, PE, IC y HN ($*p < 0.05$, Figura 13f).

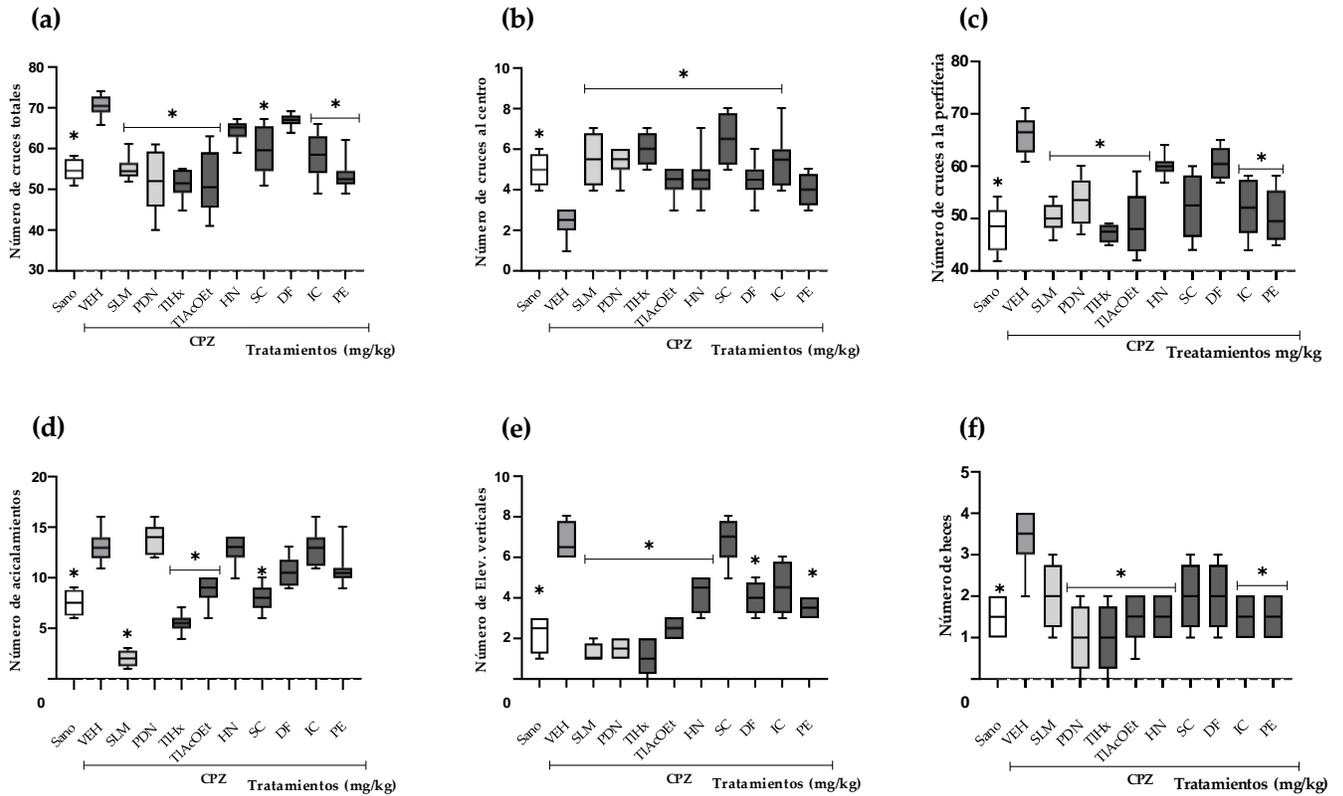


Figura 13. Efecto de *T. lucida* en la prueba de CA: Ratones BALB/c administrados con CPZ al final de la semana cinco. (a) Número de cruces totales, (b) Número de cruces al centro, (c) Número de cruces a la periferia, (d) Número de acicalamientos, (e) Número de elevamientos verticales, (f) Número de heces. Los datos se analizaron mediante el uso de ANOVA con un *post-test* Dunnett (media \pm DE), y la diferencia fue cuando $*p < 0,05$ en comparación con el grupo VEH. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIAcOEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

8.5 Evaluación del efecto de *T. lucida* sobre la permeabilidad de la BHE

En la figura 14 se observa los resultados de cerebros donde se midió la extravasación del colorante AE, la administración de CPZ resultó en un aumento significativo de la concentración del colorante, en comparación con el grupo de animales sanos ($*p < 0.05$). Sin embargo, todos los tratamientos con *T. lucida* y los fármacos de control lograron controlar la extravasación del colorante, mostrando diferencia significativas en comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$).

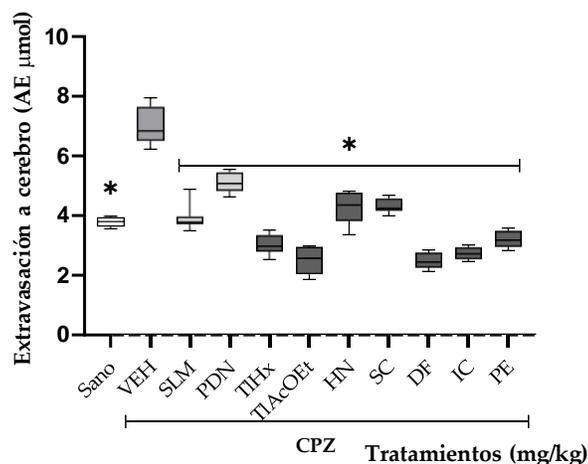


Figura 14. Efecto de *T. lucida* sobre la permeabilidad vascular en cerebro: Ratones administrados con CPZ, la densidad óptica se midió a 630 nm y las medidas se convirtieron en μmol de colorante extravasado, se utilizó el coeficiente de extinción $\text{AE } \epsilon = 7,81 \times 10^4$. Los datos muestran la media \pm DE, $*p < 0,05$, lo que indica diferencias significativas entre los grupos en comparación con el grupo VEH, utilizando la prueba t de Student. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIAcOEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

8.6 Efecto inmunomodulador de *T. lucida*

La inflamación asociada a la administración crónica de CPZ se cuantificó en el cerebro de ratones midiendo la concentración de ILs antiinflamatorias y proinflamatorias (Figura 15). La CPZ provocó una disminución en las concentraciones cerebrales de IL-4 e IL-10, mientras que aumentó los niveles de TNF- α e IL-1 β , con diferencias significativas respecto al grupo de animales sanos ($*p < 0.05$). En la IL-4 y la IL-10 los tratamientos como: SLM, PDN y TIHx incrementaron los niveles de estas ILs (a excepción de PDN para la IL-10) en cerebro (Figura 15a y 15b), induciendo un cambio significativo en comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$). Para la IL-1 β , todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo VEH ($*p < 0.05$), al reducir los niveles de esta IL proinflamatoria (Figura 15c). Para TNF- α (Figura 15d), PDN y todos los tratamientos de *T. lucida* (a excepción de IC y SC) redujeron significativamente los niveles de esta IL al compararse con el grupo VEH ($*p < 0.05$).

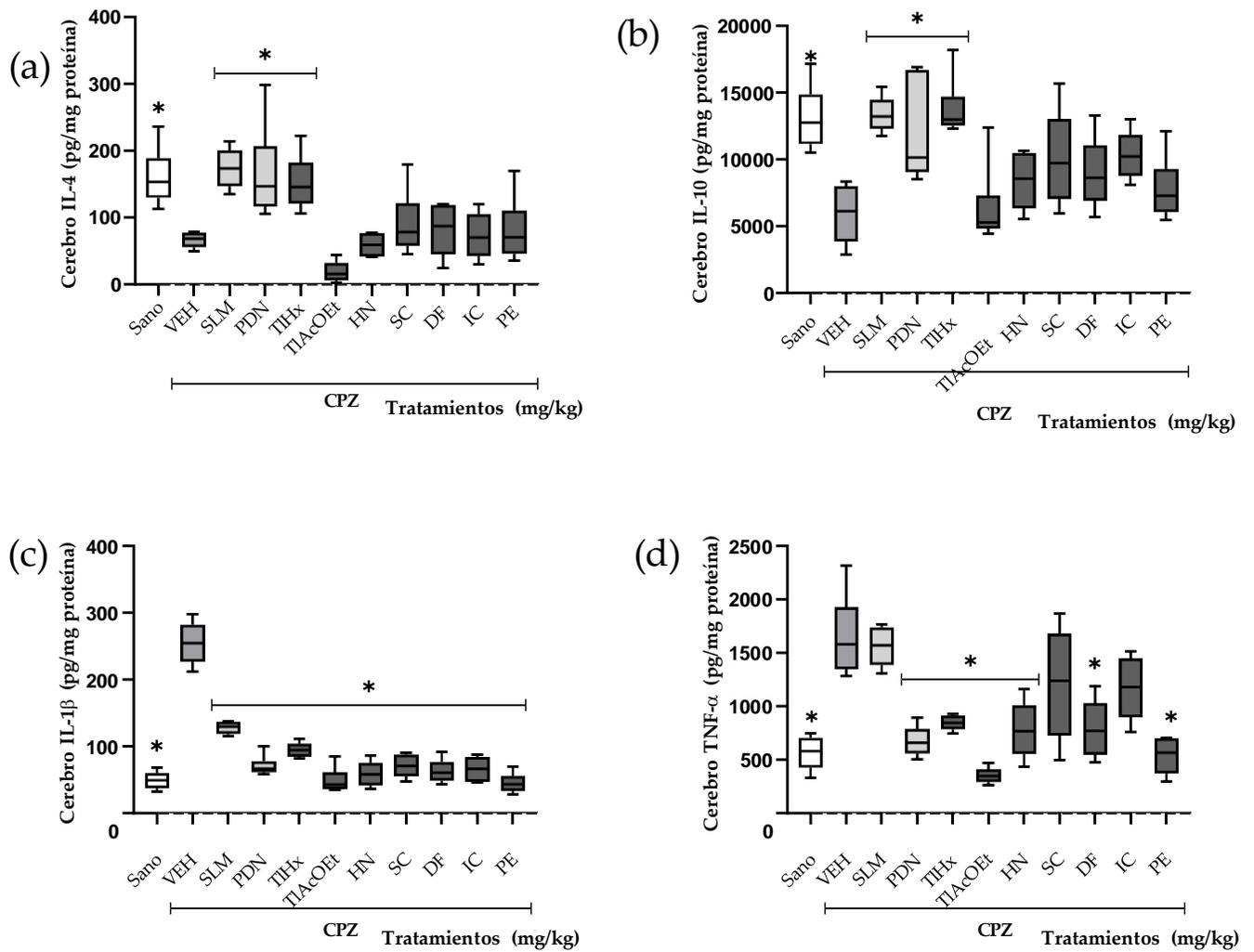


Figura 15. Efecto de *T. lucida* sobre la inmunomodulación en cerebro: ILs pro y antiinflamatorias en el cerebro: (a) IL-4, (b) IL-10, (c) IL-1 β y (d) TNF- α . Los datos muestran la media \pm DE, * $p < 0,05$, lo que indica diferencias significativas entre los grupos en comparación con el grupo VEH. Los datos se analizaron mediante el uso de ANOVA con un *post-test* Tukey. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIAcOEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

8.7 Efecto de *T. lucida* sobre el daño a hipocampo por tinción H&E

En la figura 16 se presentan cortes histológicos de la parte izquierda del hipocampo teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), que incluyen: (a) la estructura general del hipocampo, (b) el giro dentado (GD), (c) la subregión CAm4,3 2, y (d) la subregión CAm1 y el S.

En la **imagen uno**, correspondiente al hipocampo de un ratón sano se observa una estructura con una organización celular ordenada y claramente definida en las subregiones CAm y GD (a). La integridad estructural del tejido es evidente, sin signos de daño o inflamación. Con más detalle en la primera imagen del inciso b se presenta el GD en aumento de 10X y se observa una capa densa de células granulares (G), compactadas y bien organizadas. Estas células, pequeñas y con núcleo redondeado, están situadas por debajo de la capa molecular (CM), que es menos densa y contiene más fibras nerviosas. No se evidencian signos de desmielinización, vacuolización o alteraciones patológicas. Las subregiones CAm2 y CAm3 también muestran una disposición ordenada de células piramidales (P) y G, con ligeras variaciones en tamaño y densidad celular. La subregión CAm4, situada entre CAm3 y el GD, exhibe una transición en la organización celular, con una densidad que aumenta gradualmente hacia el GD (c). En la subregión CAm1, las P se presentan grandes, alineadas en una capa bien definida, con núcleos visibles y sin evidencia de daño (d).

En la **segunda imagen** se muestra el hipocampo de un ratón intoxicado con CPZ (grupo VEH). Se observa una desorganización significativa de la estructura del hipocampo, particularmente en el GD, comparado con un hipocampo sano (a). La CM del GD muestra pérdida de integridad, caracterizada por una disminución en la densidad de fibras y células (b). La infiltración de células inflamatorias, como posibles macrófagos o células gliales activadas, es evidente, dispersándose a lo largo del hipocampo y sugiriendo una respuesta inflamatoria activa a la desmielinización. Las células P y G presentan una alineación irregular, y se observa una reducción en la densidad celular (c y d), Además, se identifican áreas claras que podrían estar asociadas con la pérdida de mielina.

En la **tercera imagen** se observa el hipocampo de un ratón tratado con SLM. Al compararlo con el hipocampo de un ratón tratado solo con VEH se nota una mejora significativa. La CM y GD muestran una mejor conservación en este grupo, aunque no alcanza una normalidad completa, la CM exhibe menos signos de daño y desorganización que en ratones tratados solo con VEH (b). En la organización de las células P y G de las subregiones de CAm se observa una morfología más cercana a la normal, sin evidencia de apoptosis o necrosis (c y d). Las áreas claras, posibles indicadores de pérdida de

mielina, son menos frecuentes. No se observa infiltración de células inflamatorias, destacando una mejora significativa frente al grupo tratado solamente con VEH.

En la **imagen cuatro** se observa el hipocampo de un ratón tratado con PDN. Aunque el tejido muestra signos de daño estructural, la organización celular está mejor preservada en comparación con el hipocampo de ratones del grupo VEH (a). El tratamiento con PDN parece haber reducido significativamente la infiltración de células inflamatorias en el hipocampo. Sin embargo, todavía se observan algunas células inflamatorias dispersas, su cantidad es considerablemente menor que en los cortes de ratones tratados solo con VEH (b). Las capas de células P y G están presentes, aunque exhiben cierta desorganización y una disminución en la densidad celular (c y d), presentan una morfología más cercana a la normal en comparación con el grupo tratado únicamente con VEH. Los núcleos son más visibles y menos condensados, y hay menos signos de necrosis. También se observan menos áreas claras, sin embargo, aunque hay una mejoría, persisten áreas con daño residual significativo, incluyendo zonas con pérdida de organización celular y estructuras alteradas como el GD (b).

En la **imagen cinco**, se observa el hipocampo de un ratón tratado con TIHx. A diferencia del grupo tratado solo con VEH, la estructura celular del hipocampo, incluyendo las capas piramidales y granulares, está significativamente mejor preservada (a). Las células muestran una mayor organización y alineación, similar a lo que se observa en un hipocampo sano, indicando una restauración estructural. Se aprecia una reducción considerable en la desmielinización. Además, la presencia de células inflamatorias es mucho menor en comparación con los cortes de hipocampo tratados únicamente con VEH. La CM muestra signos de recuperación parcial, con una estructura menos dañada y un mayor número de fibras nerviosas preservadas (b). Las células G y P presentan una morfología cercana a la normal, con menos signos de necrosis y apoptosis en comparación con el grupo tratado solo con VEH. Los núcleos son visibles y muestran una condensación de cromatina menos pronunciada (c y d).

En la **imagen seis** de la misma figura, se observa el hipocampo de un ratón tratado con TIAcOEt, mostrando una preservación notable de la estructura general en comparación con los ratones tratados solo con VEH (a). Las capas de células P y G son más visibles y mejor organizadas, aunque no alcanzan la compactación observada en un hipocampo sano. La desmielinización se encuentra reducida, evidenciada por la menor presencia de áreas claras o vacuoladas. La CM del GD y otras regiones del hipocampo presentan menos signos de daño y una mayor integridad estructural en comparación con el grupo tratado solo con VEH (b). Además, la infiltración de células inflamatorias es

considerablemente menor en comparación con ratones tratados solo con VEH. Las células en general muestran una morfología relativamente normal, con núcleos bien definidos y sin signos de necrosis o apoptosis (c y d).

En la **imagen 7** se observa el hipocampo del grupo tratado con HN, se observa una notable reducción en la organización celular (a). Aunque las capas de células P y G son visibles, presentan signos de desorganización significativa y una densidad celular notablemente disminuida. A pesar del tratamiento con HN, persiste una considerable desmielinización, evidenciada por amplias áreas de vacuolización y pérdida de mielina. La CM muestra signos de alteración severa, con una desintegración pronunciada de su estructura (b). Además, las células exhiben morfologías anormales, con núcleos mal definidos y evidencias de apoptosis y necrosis en múltiples áreas (c y d). Tanto las células G como las P están afectadas.

En la **imagen 8** se observa el corte histológico de hipocampo de ratones tratado con SC. La estructura del hipocampo está relativamente bien preservada, con las capas de células P y G claramente visibles y una densidad celular moderada (a), en comparación con el grupo tratado solo con VEH. Se aprecia una notable reducción en la desmielinización, y aunque aún se identifican algunas áreas claras, la integridad de la mielina está mejor conservada. La presencia de células inflamatorias también es menor. Las capas CM y las áreas del GD muestran una buena integridad estructural, con menos signos de daño (b). Las células presentan una morfología normal, con núcleos bien definidos y menos signos de apoptosis o necrosis. Tanto las células G como las P parecen estar bien preservadas (c y d).

En la **imagen 9** se muestra el hipocampo de un ratón tratado con DF, y se observa una organización celular más clara y definida en comparación con los cortes de hipocampo de ratones tratados solo con VEH (a). La CM del GD y otras áreas del hipocampo muestran una mejor integridad estructural (b, c y d). Además, se observa una disminución considerable de la desmielinización ya que presenta menor áreas claras en comparación con otros grupos. La cantidad de células inflamatorias presentes en el tejido es menor. Las capas de células P y G están mejor alineadas y son más compactas, por lo que hay una mejor preservación de la estructura neuronal. Las células presentan una morfología normal, con núcleos bien definidos y menos signos de necrosis o apoptosis en comparación con los cortes de los grupos tratados solo con VEH.

En la **imagen diez** se muestra el hipocampo del grupo tratado con IC, y se observa una organización celular que, aunque no es completamente normal, está mejor preservada que en los cortes de ratones tratados únicamente con VEH (a). Las capas de células P y G son claras, aunque presentan signos de desorganización y se observa una reducción en la desmielinización en comparación con el grupo

VEH. La capa CM y GD exhiben daños moderados, con algunas áreas preservadas, pero también con signos de alteración estructural (b). La presencia de células inflamatorias en el tejido es notable, aunque en menor cantidad que en los ratones tratados solo con VEH. Las células G y P muestran una morfología menos comprometida que en los grupos sin tratamiento adicional, aunque aún se observan signos de apoptosis y necrosis en algunas áreas (c y d). Los núcleos de estas células son visibles, pero no tan bien definidos como en los grupos más protegidos.

En la **imagen once** se muestra el hipocampo del grupo tratado con PE, donde se observa una notable preservación de la estructura general del hipocampo, similar a la observada en el grupo sano (a). Se observa una reducción considerable en la desmielinización en comparación con los cortes de hipocampo de ratones tratados solo con VEH, lo que es evidente por la menor cantidad de áreas claras. La CM muestra una buena integridad estructural, con menos signos de daño en comparación con los grupos que no recibieron tratamiento adicional (b). La infiltración de células inflamatorias también es mucho menor. Las capas de células P y G están presentes, aunque no son tan densas como en un hipocampo completamente sano. Las células G y P en este corte presentan una morfología normal (d y e).

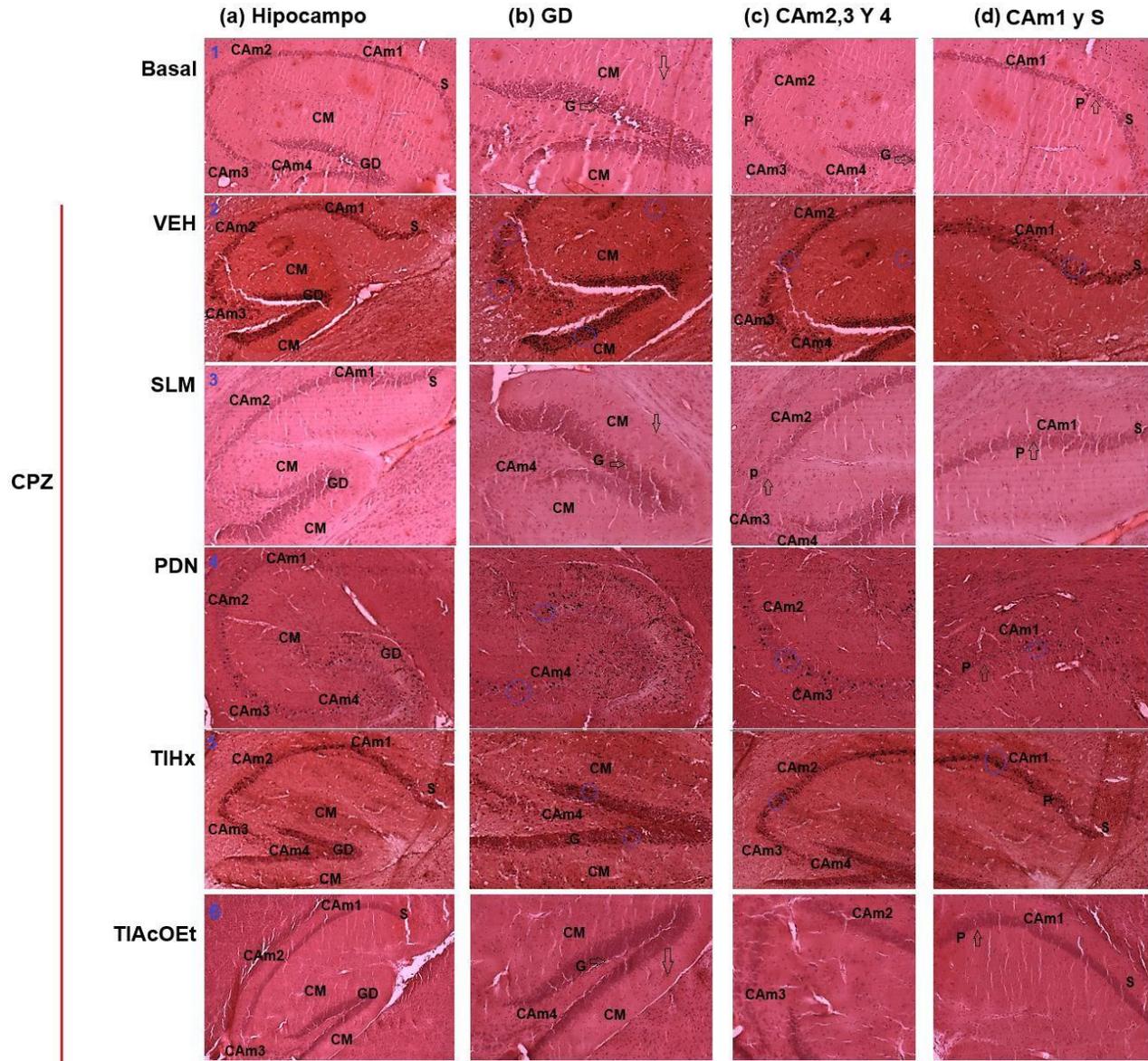
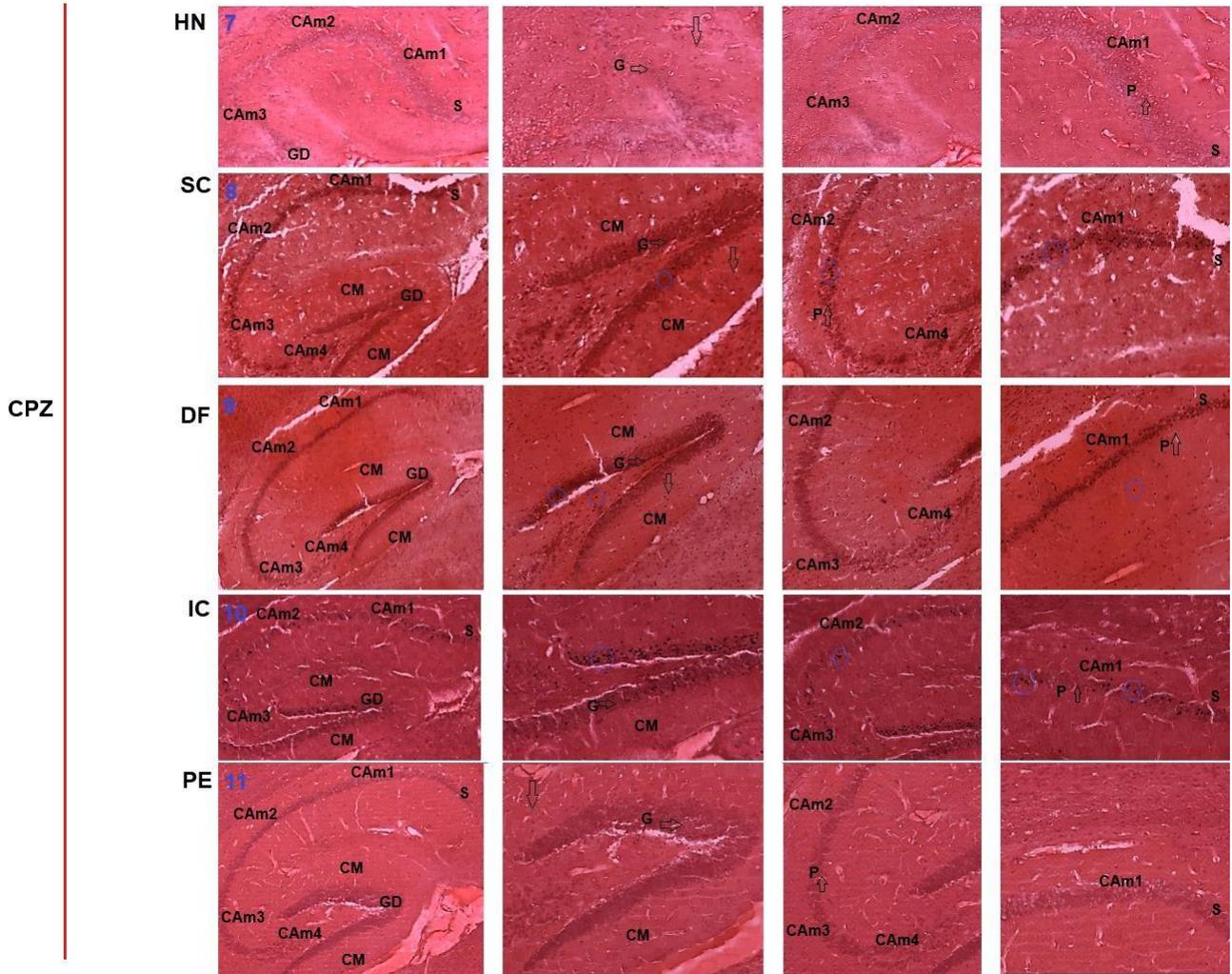


Figura 16. Histología de hipocampo: Corte de cerebro en sección sagital de ratones con administración forzada de CPZ y tratados con *T.lucida*. La imagen muestra una visión general de la formación del hipocampo por tinción H&E: (a) Hipocampo, (b) el Giro Dentado (GD), (c) el Cuerno de Amon (CA2,3 y 4) y (d) CA1 y S. El GD aparece como una estructura oscura en forma de V, con su porción abierta que rodea el área CA4 del hipocampo. La capa molecular (CM) dentro de la concavidad de CA1 y de GD. Células G (↔), Células piramidales (↑), Células inflamatorias (○), microglía (↓). Los grupos de estudio incluyen: basal, VEH, SLM, PDN, TIHx y TIACOEt. Observación por microscopio óptico a 10X. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIACOEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.



Continuación figura 16. Histología de hipocampo: Corte de cerebro en sección sagital de ratones con administración forzada de CPZ y tratados con *T.lucida*. La imagen muestra una visión general de la formación del hipocampo por tinción H&E: (a) Hipocampo, (b) el Giro Dentado (GD), (c) el Cuerno de Amon (CAm2,3 y 4) y (d) CA1 y S. El GD aparece como una estructura oscura en forma de V, con su porción abierta que rodea el área CA4 del hipocampo. La capa molecular (CM) dentro de la concavidad de CA1 y de GD. Células G (\rightarrow), Células piramidales (\uparrow), Células inflamatorias (\bigcirc), microglía (\downarrow). Los grupos de estudio incluyen: HN, SC, DF, IC, y PE. Observación por microscopio óptico a 10X. Dosis: VEH (40 mg/Kg), SLM (200 mg/Kg), PDN (2 mg/Kg), TIHx, TIAcOEt, HN, SC, DF, IC y PE a 25 mg/Kg.

9 DISCUSIÓN

Investigaciones recientes han demostrado que diferentes extractos de *T. lucida* poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020; Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Porras Dávila *et al.*, 2022a; Santibáñez *et al.*, 2023). El análisis por CLAR de los extractos TIHx y TIAcOEt (Figura 9), permitió la identificación de cinco cumarinas con actividad biológica: IC, HN, DF, SC y PE. Las cumarinas identificadas en este estudio ya han sido reportadas en otras especies además de *T. lucida* (Chaves *et al.*, 2017), aunque IC y PE sólo han sido identificadas en esta última especie (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020). Las cumarinas son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que presentan una gran diversidad estructural. Diferentes grupos funcionales pueden unirse al esqueleto básico de la cumarina (2H-cromen-2-ona), formando así nuevas moléculas con variadas propiedades biológicas (Bubols *et al.*, 2013). Estudios farmacológicos han destacado el potencial terapéutico de las cumarinas para el tratamiento de enfermedades del SNC, considerándolas compuestos con propiedades antioxidantes y neuroantiinflamatorias (Santibáñez *et al.*, 2023). Este es un aspecto relevante en el contexto de enfermedades desmielinizantes como la EM, donde el EO y la inflamación desempeñan un papel crucial en la patogénesis y progresión de la enfermedad (Anisha Doshi & Jeremy Chataway, 2017).

Antes de evaluar los efectos de las cumarinas identificadas, se indujo daño motor en ratones mediante la administración de CPZ a través de dos métodos: por alimentación y por vía forzada. Como se ha documentado, la administración de CPZ provoca la apoptosis de los OLG, lo que conduce a la desmielinización, seguida de la activación de células gliales, características que reproducen aspectos clave de la EM, como la neurodegeneración y la neuroinflamación (Gudi *et al.*, 2014; Torkildsen *et al.*, 2008; Zhan *et al.*, 2020). Los resultados de esta comparación indicaron que ambos métodos de administración son efectivos para inducir daño motor en los ratones, así como para comprometer la integridad de la BHE. Los déficits en la función motora inducidos por la CPZ, ya sea administrada a través del alimento o por vía forzada durante tres, cuatro y cinco semanas, fueron evaluados mediante tres pruebas conductuales que incluyen: Parámetros de Irwin, Rr y CA. Durante la prueba de Irwin, se observó que todos los ratones tratados solo con CPZ al 0.2% (VEH-alimento) y por administración forzada (VEH) presentaron cambios fisiológicos, como piloerección y amontonamiento, los cuales no fueron observados en el grupo sano (Tabla 9). La piloerección, una reacción mediada por el sistema nervioso simpático (SNS), juega un papel crucial en diversos mecanismos fisiológicos, tales como la termorregulación, la regulación de la frecuencia cardíaca, el tono muscular y el incremento de la presión arterial. Además, el comportamiento de amontonamiento, que a menudo se observa en

situaciones de frío, podría interpretarse como una estrategia de regulación térmica a través del apego social. Estas respuestas también se manifiestan ante estímulos emocionales intensos, como la tristeza, el miedo, el dolor, las amenazas, el estrés y la ansiedad, reflejando la compleja interacción entre las respuestas emocionales y fisiológicas en el cuerpo (McPhetres & Zickfeld, 2022). En ambos métodos de administración, la SLM mostró una disminución en el amontonamiento, particularmente en la semana cinco. Sin embargo, la protección proporcionada fue limitada. La prueba de Rr, utilizada en varios estudios para cuantificar el rendimiento motor en ratones tratados con diferentes agentes, como la clorpromazina o la hidroxicina (Lubrich *et al.*, 2022), reveló que los grupos tratados solo con CPZ, ya sea por alimentación o administración forzada, presentaron una marcada disminución en su resistencia y equilibrio durante las semanas cuatro y cinco. Esto se evidenció en un tiempo significativamente reducido de permanencia en el Rr en comparación con los ratones sanos (Figura 10). Por otro lado, la SLM demostró ser efectiva en ambos modelos de administración, incrementando el tiempo de permanencia en el Rr, especialmente en la etapa final del experimento. Este hallazgo sugiere que la SLM posee un efecto neuroprotector, ayudando a preservar la función motora y el equilibrio en los ratones tratados, lo cual se relaciona con sus conocidos efectos neuroprotectores (Guo *et al.*, 2019). El estudio de CA se utilizó para evaluar el comportamiento espontáneo de los roedores, con énfasis en la excitación o inhibición del aparato locomotor, así como en la detección de efectos similares a la ansiedad. Esto se basa en el comportamiento natural de los roedores a buscar áreas que les ofrezcan protección en un entorno desconocido (Andrade *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en la prueba de CA mostraron que los animales sanos exhibieron un mayor número de CP, CT, EV, y una reducción en acicalamientos durante la semana tres, cuatro y cinco, en comparación con los ratones tratados solo con CPZ (VEH-alimento y VEH), especialmente en la semana cinco (Tabla 10 y 11). Por otro lado, el tratamiento con VEH-alimento + SLM mostró una disminución en los episodios de acicalamientos durante la semana tres, cuatro y cinco, así como un aumento en los EV durante la semana cuatro y cinco, en comparación con el grupo VEH-alimento. De manera similar, el grupo VEH + SLM presentó un aumento en los CP, CT y EV, junto con una disminución en acicalamientos en la semana cinco, en comparación con el grupo VEH. Los resultados obtenidos en este estudio muestran diferencias significativas en la coordinación motora y el comportamiento espontáneo entre los diferentes grupos experimentales, lo que refleja los efectos diferenciados de los tratamientos en la actividad locomotora y posiblemente en los niveles de ansiedad. La administración de CPZ provoca una serie de alteraciones conductuales asociadas con ansiedad y depresión, las cuales son evidentes en la prueba de CA. Este comportamiento es consistente con lo observado en otros estudios, donde la CPZ induce un entorno proinflamatorio en el SNC, afectando la conducta de

los roedores (Zhan *et al.*, 2020; Zohara Sternberg, 2012). En particular, el aumento de acicalamientos, un comportamiento innato en roedores sanos puede transformarse en un patrón repetitivo y estereotipado como respuesta a trastornos del SNC, como el estrés y la ansiedad (Liu *et al.*, 2021). Este cambio en el comportamiento, junto con la hipolocomoción, la piloerección y el amontonamiento observados en los ratones intoxicados con CPZ, sugiere un daño neurodegenerativo significativo, respaldando la idea de que la CPZ induce un daño considerable en el SNC. Estudios previos han reportado que los primeros signos de daño se manifiestan a partir de la tercera semana de exposición a CPZ, y estos síntomas se agravan con el tiempo (Zhan *et al.*, 2020). Las evaluaciones conductuales realizadas en este trabajo confirman el impacto de la CPZ en el comportamiento motor, lo que sugiere una desmielinización progresiva. Las pruebas conductuales, como las utilizadas en este estudio, han demostrado ser marcadores sustitutos valiosos para la detección de eventos desmielinizantes (Torkildsen *et al.*, 2008). Durante el proceso de desmielinización, se produce la activación de astrocitos, microglía y otras células, lo que genera un entorno proinflamatorio mediado por la liberación de ERO, ILs y quimiocinas, exacerbando el daño neuronal (Zirngibl *et al.*, 2022). Este proceso inflamatorio y neurodegenerativo se ve agravado por la alteración de la BHE. La composición estructural de la BHE es compleja, lo que permite proteger el cerebro de la exposición a células inmunes, sustancias neurotóxicas derivadas de metabolitos endógenos, proteínas o xenobióticos ambientales. Por ello, una alteración en la permeabilidad de la BHE se asocia con diversos estímulos, incluyendo inflamación, EO y estrés traumático (Abbott *et al.*, 2010; Berghoff *et al.*, 2017). En este estudio, se observó daño a la BHE, evaluado mediante la extravasación de AE, un colorante con alta afinidad por la albúmina, que en condiciones fisiológicas normales no atraviesa la BHE (Abbott *et al.*, 2010). La administración de CPZ, tanto por alimentación como por vía forzada, provocó la extravasación del colorante en comparación con el grupo sano (Figura 11), indicando un aumento de la permeabilidad de la BHE, probablemente debido al proceso neuroinflamatorio. Estos resultados sugieren que la administración de CPZ afecta significativamente la integridad de la BHE en los grupos VEH-alimento y VEH. Sin embargo, el tratamiento con SLM (VEH-alimento) mostró un efecto protector sobre la BHE en la quinta semana, lo cual es crucial para prevenir la entrada de toxinas y células inmunitarias en el SNC y para mitigar la neuroinflamación y la desmielinización (Abbott *et al.*, 2010).

A partir de los resultados obtenidos, se decidió evaluar el efecto de los extractos TIHx y TIAcOEt, junto con las cinco cumarinas, incrementando la dosis de SLM y utilizando PDN como control farmacológico. El enfoque se centró en analizar el impacto sobre el daño motor, la permeabilidad de la BHE, la neuroinflamación y el daño en el hipocampo, empleando la tinción H&E para la evaluación histológica utilizando el modelo de administración forzada de CPZ, un modelo que requiere más manipulación y,

por lo tanto, podría ser más estresante para los animales, pero también asegura que los ratones reciban una dosis exacta de CPZ lo cual es crucial para la reproducibilidad y la consistencia de los resultados. Así, la ruta de aplicación es la principal diferencia entre este diseño y el propuesto por otros investigadores, quienes han utilizado principalmente la administración a través de la dieta. (Franco-Pons *et al.*, 2007; Gudi *et al.*, 2014; Kopanitsa *et al.*, 2021; Torkildsen *et al.*, 2008).

Los animales con CPZ (enfermos) o sin CPZ (sanos) y animales enfermos pero tratados con distintos tratamientos fueron sometidos a las pruebas de conductuales antes mencionadas (prueba de Irwin, CA y Rr). Durante la prueba de Irwin, se observó piloerección y amontonamiento en todos los grupos, excepto en el grupo sano. (Tabla 12 y 13). El grupo tratado solo con CPZ (VEH) presentó un aumento progresivo de piloerección, comenzando con un 20% en la segunda semana y alcanzando un 93.3% en la cuarta y quinta semana. También, este grupo mostró un aumento en el amontonamiento, comenzando con un 26.6% en la primera semana y alcanzando el 100% en la quinta semana. El amontonamiento en los roedores es un indicador de estrés y ansiedad (Mathiasen & Moser, 2018). El grupo tratado con SLM mostró un aumento gradual en la piloerección, alcanzando un 60% y 33.3% de amontonamiento en la quinta semana, lo que sugiere una protección moderada proporcionada por la SLM. En contraste, el grupo tratado con PDN demostró una mayor protección, con solo un 26% de piloerección y un 20% de animales amontonados en la quinta semana. Estos resultados indican una protección notable contra los daños inducidos por CPZ, posiblemente debido a los efectos antiinflamatorios de la PDN (Krasselt & Baerwald, 2016). Estos hallazgos sugieren que la inflamación podría desempeñar un papel importante en las respuestas observadas. Los grupos tratados con TIHx y TIACOEt mostraron una notable reducción en la piloerección en comparación con el grupo VEH, especialmente evidente en la quinta semana, con solo un 26% y 20% respectivamente. Además, el grupo TIHx mantuvo un nivel de amontonamiento relativamente bajo durante todo el estudio, con una disminución al 20% en la quinta semana, mientras que en TIACOEt no se observó el parámetro en la quinta semana. El análisis de las cinco cumarinas en relación con los parámetros de Irwin observados indica que cada una ofrece un nivel de protección distintivo, asociado a la presencia y disposición de sus grupos funcionales. La SC, que contiene dos grupos metoxi en las posiciones C6 y C7, mostró un efecto superior durante las semanas tres, cuatro y cinco, como lo evidencian los menores porcentajes de piloerección, y también redujo el amontonamiento durante las semanas dos, tres y cuatro en comparación con el grupo VEH. La DF, que posee tres grupos metoxi en las posiciones C5, C6 y C7, demostró efectos óptimos en las semanas dos y cuatro en términos de piloerección y fue particularmente efectiva en reducir el amontonamiento durante las semanas dos, tres y cuatro, con una eliminación completa de este parámetro en la semana cinco. Por su parte, la PE destacó al

alcanzar los porcentajes más bajos de piloerección en las semanas dos y cinco, y al reducir el amontonamiento en la semana uno, logrando también la eliminación del parámetro en la semana cinco, posiblemente debido a la presencia del grupo metoxi. Estos hallazgos sugieren que los grupos metoxi juegan un papel crucial en la protección observada. Aunque HN e IC también mostraron efectos notables, los porcentajes más bajos de piloerección en cada semana se registraron con SC, DF y PE, lo que subraya la importancia de las sustituciones metoxi para la modulación de la respuesta protectora. Estos resultados sugieren que los compuestos activos presentes en estos extractos poseen propiedades neuroprotectoras y ansiolíticas. Las respuestas fisiológicas observadas en los ratones tratados únicamente con CPZ fueron consistentes con los resultados obtenidos en las pruebas de Rr y CA.

La evaluación de la coordinación y motricidad de los ratones, realizada a diferentes velocidades en el Rr, reveló que los grupos tratados con SLM, PDN, extractos y cumarinas de *T. lucida* (TIHx, TIAcOEt, HN, SC, DF, IC y PE) mostraron una mejora significativa en el tiempo de permanencia en el Rr en comparación con el grupo VEH, que presentó una permanencia significativamente reducida en relación con el grupo sano. Además, la mejora observada en los grupos tratados indica que tanto los grupos metoxi como los isoprenilos presentes en las cumarinas podrían estar confiriendo efectos neuroprotectores, los cuales parecen depender de la localización específica del daño en el SNC. En el SNC, estructuras como el cerebelo, el tronco encefálico y la corteza motora son esenciales para la regulación de la motricidad y la coordinación (Franco-Pons *et al.*, 2007). El cerebelo es crucial para mantener la fuerza, el equilibrio y la coordinación, mientras que el tronco encefálico juega un papel vital en la transmisión de señales entre el cerebro y la médula espinal hacia el SNP (Zohara Sternberg, 2012). La desmielinización en estas áreas puede interrumpir gravemente la función axonal, comprometiendo la eficacia de las sinapsis y generando disfunción en la transmisión de señales nerviosas. Esto se manifiesta en síntomas motores y neurológicos, como la pérdida de coordinación, equilibrio y control muscular, que son características de la EM y otros trastornos desmielinizantes (Baecher-allan *et al.*, 2018). Sin embargo, la intervención con los tratamientos evaluados demostró una notable capacidad para restaurar la coordinación, fuerza y resistencia, lo que indica su potencial para proteger contra la neurodegeneración o incluso promover la recuperación funcional en un entorno de daño inducido por CPZ. Es importante destacar que, aunque la mayoría de los tratamientos mostraron eficacia, el grupo tratado con SLM a una velocidad específica de 36 RPM no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo VEH. Esto podría señalar una limitación en la eficacia de la SLM bajo ciertas condiciones específicas de velocidad, lo que sugiere que su capacidad neuroprotectora puede depender de la intensidad de la actividad o del grado de daño inducido. La

prueba de CA presentada en la Figura 13 demuestra que la administración de CPZ induce cambios significativos en la locomoción y en los niveles de ansiedad, que son factores críticos en el comportamiento de los ratones cuando se exponen a este entorno. Al comparar el grupo VEH con el grupo sano, se observan alteraciones en la función del SNC. El aumento de CP, CT y EV, así como la disminución de los CC en el grupo VEH sugiere una sobreexcitación del SNC y un incremento en los niveles de estrés. Esta respuesta se manifiesta, además, en la preferencia de los ratones por mantenerse cerca de las paredes y viajar predominantemente en la periferia del campo (tigmotaxis), un comportamiento que suele intensificarse en situaciones de daño neurológico o lesión (Simon *et al.*, 1094). La tendencia a evitar el centro del CA es un claro indicador de ansiedad elevada; en contraste, los animales con menores niveles de ansiedad tienden a explorar más el centro del campo (Kraeuter *et al.*, 2019). Asimismo, el aumento en el comportamiento de acicalamientos observado en el grupo VEH es otro indicador de ansiedad. Es probable que estos comportamientos anormal sean consecuencia directa del daño motor y cognitivo causado por la desmielinización de diversas estructuras del SNC. Además, está bien establecido que los pacientes con EM progresivas suelen presentar una sobreestimulación del SNC debido a la inflamación crónica. Entonces el aumento de acicalamientos, la hiperlocomoción, la piloerección y el amontonamiento observados en el grupo VEH indican una sobreestimulación del SNC y una probable activación del sistema noradrenérgico, especialmente en regiones del sistema límbico como el cuerpo caloso, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala y el mesencéfalo, que son responsables de modular las emociones y el comportamiento (Liu *et al.*, 2021; McPhetres & Zickfeld, 2022; Zohara Sternberg, 2012).

La capacidad de *T. lucida* para restaurar el deterioro motor y los parámetros de emocionalidad, evaluados en la prueba de CA, mostró resultados consistentes, particularmente en los ratones tratados con los extractos TIHx y TIACOEt. Estos tratamientos contrarrestaron eficazmente los efectos de la CPZ en las seis variables analizadas, en comparación con el grupo VEH. La composición química de ambos extractos, rica en cumarinas, sugiere que estos compuestos desempeñan un papel crucial en los efectos observados. Sin embargo, la actividad de cada cumarina varía según los grupos funcionales. Por ejemplo, la HN, una cumarina monosustituida, controló tres de las seis variables en CA (CC, EV y H), mientras que la SC, una cumarina disustituida, influyó significativamente en otras tres variables (CC, CT y acicalamientos). La DF, una cumarina trisustituida, mostró eficacia en solo dos parámetros (CC y EV). Estos resultados sugieren que a medida que aumenta el grado de sustitución con grupos metoxi en diversas posiciones, la efectividad del compuesto en la prueba de CA puede disminuir. Por otro lado, la IC, también monosustituida, logró influir en cuatro variables (CP, CC, CT y H), mientras que la PE controló otras cuatro de las seis variables (CP, CT, EV y H). Estas

cumarinas, consideradas como complejas debido a la presencia de un grupo funcional isoprenilo (2-metil-1,3-butadieno) en la posición C7, sugieren que este grupo isoprenilo en esa posición podría potenciar la capacidad del compuesto para mitigar el daño inducido por CPZ, mejorando la locomoción. En comparación, los grupos tratados con los compuestos farmacológicos SLM y PDN lograron controlar cinco de las seis variables analizadas, con PDN no controlando la variable de acicalamientos y SLM sin un impacto significativo en la variable H. Estos resultados subrayan la importancia del número de sustituciones en la actividad neuroprotectora y la capacidad de estos compuestos para mitigar los efectos de la CPZ, destacando a *T. lucida* como un agente prometedor en el tratamiento de daños neurodegenerativos.

Los estudios sobre extractos y compuestos de *T. lucida* han mostrado un impacto notable en el SNC, resaltando su relevancia en el tratamiento de diversas condiciones neurológicas. Por ejemplo, se ha documentado que la IC de *T. lucida* posee propiedades antiinflamatorias destacadas, reduciendo el edema de ratón de manera similar a medicamentos convencionales como la indometacina y efectivamente controlando el infiltrado celular (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha reconocido recientemente el potencial antipsicótico de la HN y la DF de la misma planta, demostrado en modelos murinos de psicosis aguda inducida por ketamina. Este estudio evaluó aspectos como el comportamiento motor, la depresión y la memoria, y se observó que estos compuestos potencian la catalepsia inducida por haloperidol, indicando interacciones con la neurotransmisión glutamatérgica y dopaminérgica, fundamentales en trastornos como la esquizofrenia (Porrás-Dávila *et al.*, 2022b). Estos descubrimientos son especialmente significativos dado que la ketamina, también usada como antidepresivo, ha mostrado revertir los efectos de la CPZ. Investigaciones como las de Wang y colaboradores (2022), han evidenciado que tratamientos repetidos con (R)-ketamina mejoran la desmielinización y activan la microglía en el cerebro de ratón (Wang *et al.*, 2022). Un estudio de 2016 destacó que los extractos de *T. lucida* inhiben la ansiedad y promueven la sedación en ratones a través de la interacción con los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico y GABAérgico, efectos probablemente atribuibles a la DF (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Además, investigaciones recientes han enfatizado el papel de la HN, DF y la SC en la neuroprotección y la inmunomodulación, destacando su capacidad para mitigar la neuroinflamación en ratones y mejorar la salud general del SNC (Santibáñez *et al.*, 2022, 2023). La SC, en particular, ha mostrado propiedades antinociceptivas comparables a analgésicos convencionales en estudios con modelos animales, aliviando el dolor sin causar daño gástrico y potencialmente reduciendo el daño gástrico en combinación con ketorolaco. La interacción con receptores opioides y 5-HT1A subraya su efectividad y seguridad como analgésico (González-Trujano *et al.*, 2019). En resumen, las cumarinas estudiadas

de *T. lucida*, incluyendo IC, HN, DF, PE y SC, han demostrado propiedades farmacológicas notables, cada una con contribuciones significativas en el tratamiento de condiciones neurológicas y de dolor.

La capacidad de las cumarinas para atravesar la BHE en modelos de ratones con neuroinflamación constituye una ventaja significativa para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación del SNC. Este descubrimiento implica que estos compuestos pueden acceder directamente al tejido cerebral afectado, potenciando su eficacia terapéutica en el tratamiento de trastornos neuroinflamatorios (Santibáñez *et al.*, 2022). En este estudio, se analizó la permeabilidad de la BHE utilizando la técnica de extravasación del colorante AE administrado por inyección intravenosa. Este método permitió evaluar con precisión la integridad de la BHE en contextos de inflamación cerebral. Los resultados de este estudio demostraron que la CPZ aumenta la permeabilidad vascular de cerebro (figura 14). El aumento de la permeabilidad de la BHE por intoxicación con CPZ se ha asociado a procesos neuroinflamatorio secundario a la apoptosis de OLG. Esta apoptosis desencadena la liberación de ILs y quimiocinas, que activan otras células, como astrocitos y microglía, fomentando un ambiente proinflamatorio (Zirngibl *et al.*, 2022). Sin embargo, todos los tratamientos con *T. lucida*, SLM y PDN mostraron efectos neuroprotectores, al mostrar diferencias significativas comparados con el grupo VEH, demostrando que pueden proteger la BHE. Estudios previos también han demostrado que una fracción química de *T. lucida* que contenía las cinco cumarinas aquí mencionadas protege la BHE en modelos de neuroinflamación inducida por LPS (Santibáñez *et al.*, 2022). Estudios sobre estas cumarinas han demostrado tener efecto protector en otros órganos de ratón, por ejemplo, SC ha demostrado proteger el miocardio de la isquemia inhibiendo el EO y la apoptosis celular (Wan *et al.*, 2018). En el caso del PDN, un fármaco antiinflamatorio del grupo de los GC que también actúa como inmunosupresor, inhibe la actividad de la fosfolipasa A2, lo cual disminuye la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de las membranas celulares. Esta acción previene la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. También inhibe la migración de neutrófilos hacia áreas de inflamación, la permeabilidad capilar, el edema y la acumulación de mastocitos asociada con la liberación de histamina. Sin embargo, la administración a largo plazo de PDN puede causar efectos secundarios como daño renal, depresión, ansiedad, demencia y osteoporosis, lo que podría contribuir al deterioro del paciente con EM (Buttgereit *et al.*, s/f; Krasselt & Baerwald, 2016). Experimentos celulares también han mostrado que la SLM puede inhibir una variedad de vías de señalización relacionadas con la inflamación (como la vía de NF-κB) (Wadhwa *et al.*, 2022).

El mecanismo de acción de la CPZ aún no está completamente esclarecido. Sin embargo, Zirngibl y colaboradores han propuesto dos posibles vías mediante las cuales la CPZ podría inducir la

desmielinización. El primero es que el daño generado en los OLG es causado por una disfunción mitocondrial o una síntesis reducida de mielina, un mecanismo llamado "daño celular intrínseco" (Zirngibl *et al.*, 2022). Es bien conocido que la CPZ provoca anomalías mitocondriales en el hígado de los ratones, como el agrandamiento de las mitocondrias. Esto afecta gravemente la tasa metabólica y la fosforilación oxidativa al reducir la actividad de enzimas mitocondriales que utilizan cobre como cofactor, tales como la monoaminoxidasa y el citocromo c oxidasa (Cyt c oxidasa) (Kesterson & Carlton, 1971; Suzuki, 1969). El segundo mecanismo implica daño a los OLG causado por moléculas inflamatorias liberadas por células residentes del cerebro, como los astrocitos y la microglía, o por células inmunitarias periféricas, como neutrófilos y células T. Debido a que este mecanismo de acción es mediado por factores externos a los OLG, se denomina "daño celular extrínseco".(Zirngibl *et al.*, 2022). Este segundo mecanismo propuesto, involucra una respuesta inmune compleja. Se ha observado que las células T presentes durante la administración de CPZ son mínimas, por lo que se cree que no hay afectación de la BHE (Zhan *et al.*, 2020). Recientemente, Kaddatz y colaboradores encontraron números reducidos de células T CD8+ citotóxicas e incluso menos células T CD4 acumuladas dentro del cuerpo caloso de ratones tratados con CPZ hasta la semana cinco (Kaddatz *et al.*, 2021). Se ha propuesto que el efecto de la CPZ sobre la desmielinización en el SNC se debe, en parte, al aumento del TNF- α y su efecto citotóxico sobre los OLG (Pasquini *et al.*, 2007). Es probable que la capacidad de *T. lucida* para contrarrestar los efectos de la CPZ esté relacionada con su acción sobre el TNF- α y la IL-1 β (Figura 15, incisos c y d), dos ILs clave en el desarrollo de la EM (Barthelmes *et al.*, 2016).

Nuestros resultados mostraron que la CPZ induce un aumento en las ILs proinflamatorias y una reducción en las ILs antiinflamatorias en comparación con el grupo sano, como se observa en la Figura 15. En este estudio, solo los tratamientos con SLM, PDN y TIHx lograron un aumento significativo en los niveles de ILs antiinflamatorias, como IL-4 e IL-10 (Figura 15, incisos a y b). Aunque las cumarinas no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo VEH, se observó una tendencia al aumento en los niveles de IL-10 en los tratamientos con HN, SC, DF e IC.

En cuanto a las ILs proinflamatorias, TNF- α e IL-1 β , nuestros resultados indicaron que todos los tratamientos fueron efectivos en controlar los niveles de IL-1 β en comparación con el grupo VEH. Sin embargo, solo los tratamientos con PDN y TIHx lograron una reducción significativa en los niveles de TNF- α . Es notable que, aunque no alcanzaron significancia estadística, se observó una tendencia a la disminución de TNF- α en los tratamientos con las cumarinas HN, DF, IC y PE, lo que podría atribuirse en gran medida a la presencia del grupo isoprenilo, especialmente dado que TIHx está compuesto predominantemente por IC. La sinergia entre las cinco cumarinas podría potenciar su efecto

neuroantiinflamatorio. TNF- α e IL-1 β son ILs proinflamatorias clave en el sistema inmunológico, desempeñando un papel crucial en la respuesta inflamatoria y en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, incluyendo la EM. Aunque ambas ILs comparten algunas vías de señalización, como NF- κ B, MAPK y AP-1, también activan rutas únicas. Esto sugiere que los compuestos de *T. lucida* podrían mediar respuestas biológicas distintas, dependiendo de qué IL esté predominantemente involucrada. Además, un estudio realizado en 2020 informó que TIHx mostró el mejor efecto al inhibir un 92.7% del edema en orejas de ratón, lo que sugiere un posible mecanismo de acción a través de la inhibición de la enzima COX-2 (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020).

Numerosos estudios, han demostrado déficits funcionales inducidos por la intoxicación por CPZ. Estos déficits funcionales podrían estar asociados por daño a estructuras del SNC (Zhan *et al.*, 2020). También diversos estudios han informado que estructuras de la materia gris se encuentran alteradas en los pacientes con EM. De estas estructuras de materia gris, el hipocampo es un sitio predilecto para las lesiones desmielinizadas (Zhu *et al.*, 2021). Se ha observado en el modelo experimental de desmielinización inducida CPZ, daño en la mielina en varias regiones de materia gris, incluyendo la corteza (Silvestroff *et al.*, 2012; Skripuletz *et al.*, 2008), el hipocampo (Koutsoudaki *et al.*, 2009; Rocca *et al.*, 2018) y el cerebelo (Skripuletz *et al.*, 2010). De manera consistente, un estudio previo encontró que la desmielinización también se presenta en el hipocampo de pacientes con EM (Kooi *et al.*, 2011). Se ha reportado que los trastornos psiquiátricos son frecuentes en pacientes con EM, especialmente la depresión y la ansiedad (Gay *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2021). La alteración de la estructura del hipocampo también se observa en el proceso patológico de diversos trastornos psiquiátricos (de Diego-Adelino *et al.*, 2013; Kraguljac *et al.*, 2013; Nenadic *et al.*, 2015). A nivel cognitivo, las alteraciones estructurales en el hipocampo se asocian con procesos implicados en el aprendizaje y la memoria, mientras que, a nivel conductual, estas alteraciones pueden contribuir al sesgo emocional. La desmielinización del hipocampo en pacientes con EM se ha correlacionado con trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad, siendo la ansiedad reportada en aproximadamente el 35% de los pacientes con EM (Hausleiter *et al.*, 2009). Sin embargo, la fisiopatología del aumento de la ansiedad en estos pacientes aún no está clara. Estudios previos han informado que el comportamiento de ansiedad en pacientes con EM se asocia con la desmielinización y la inflamación en estructuras del SNC, como la médula espinal y el hipocampo (Gentile *et al.*, 2015; Peruga *et al.*, 2011). En este estudio, la comparación del hipocampo entre ratones sanos y aquellos tratados con VEH reveló diferencias en cuanto a estructura, organización celular, densidad celular, y la presencia de áreas claras debido a la desmielinización. Además, se observó una marcada migración de células inflamatorias hacia esta región (Figura 16). Estos hallazgos demuestran que la CPZ provoca daños

severos en el hipocampo, los cuales están asociados con comportamientos similares a la ansiedad. Los mecanismos subyacentes a la desmielinización del hipocampo que conducen al comportamiento ansioso podrían estar asociados con una densidad reducida de sitios sinápticos (Dutta *et al.*, 2011; Papadopoulos *et al.*, 2009) y la interrupción de la sinapsis excitatoria y la cascada de señalización neuronal (Dutta *et al.*, 2011). Por otro lado, los diferentes tratamientos muestran diversos grados de eficacia en la protección contra los daños inducidos por CPZ.

El tratamiento con SLM en combinación con VEH mostró una notable mejora en la integridad estructural del hipocampo, evidenciada por una reducción significativa en las áreas de desmielinización y sin aparente infiltración de células inflamatorias en comparación con el grupo VEH. La preservación de la arquitectura del hipocampo sugiere que SLM ejerce un efecto protector. De manera similar, el tratamiento con PDN en combinación con VEH redujo significativamente la infiltración de células inflamatorias en el hipocampo, lo que indica una respuesta antiinflamatoria efectiva. Sin embargo, en este grupo persistieron áreas con daño residual, especialmente en la CM y GD, donde se observó desorganización celular.

Por otro lado, los extractos de *T. lucida* mostraron efectos neuroprotectores destacables. En particular, TIAcOEt logró preservar la estructura del hipocampo con una organización celular cercana a la normal y una marcada reducción en la desmielinización y en la infiltración de células inflamatorias. Este efecto sugiere un potente mecanismo de protección estructural y funcional en el tejido hipocampal. En contraste, TIHx, aunque mostró mejoras significativas en comparación con el grupo VEH, presentó mayor infiltración de células inflamatorias y áreas de desmielinización en comparación con TIAcOEt, lo que indica que su efecto protector es reducido. En cuanto a las cinco cumarinas estudiadas, los tratamientos con SC, DF, IC, y PE mostraron mejoras considerables en la integridad estructural del hipocampo, con mejor organización celular y mayor densidad de fibras en comparación con el grupo VEH. Todas las cumarinas redujeron la infiltración de células inflamatorias (incluida HN), IC mostró más regiones con infiltración de células inflamatoria en comparación con HN, SC, DF y PE, aunque en menor cantidad que en el grupo VEH. Asimismo, IC presentó más áreas de desmielinización en comparación con las otras cumarinas, lo que podría estar relacionado con la ausencia del grupo metoxi en su estructura, reduciendo su eficacia en el control del daño tisular. Este análisis sugiere que las cumarinas con múltiples sustituciones de grupos metoxi y la presencia de isoprenilos son más efectivas para mitigar el daño inducido por CPZ, mientras que la falta del grupo metoxi en IC podría haber limitado su capacidad para controlar la infiltración celular y, en consecuencia, la desmielinización. Las propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias de las cumarinas de *T. lucida* están fuertemente influenciadas por las sustituciones de grupos funcionales. Las sustituciones de

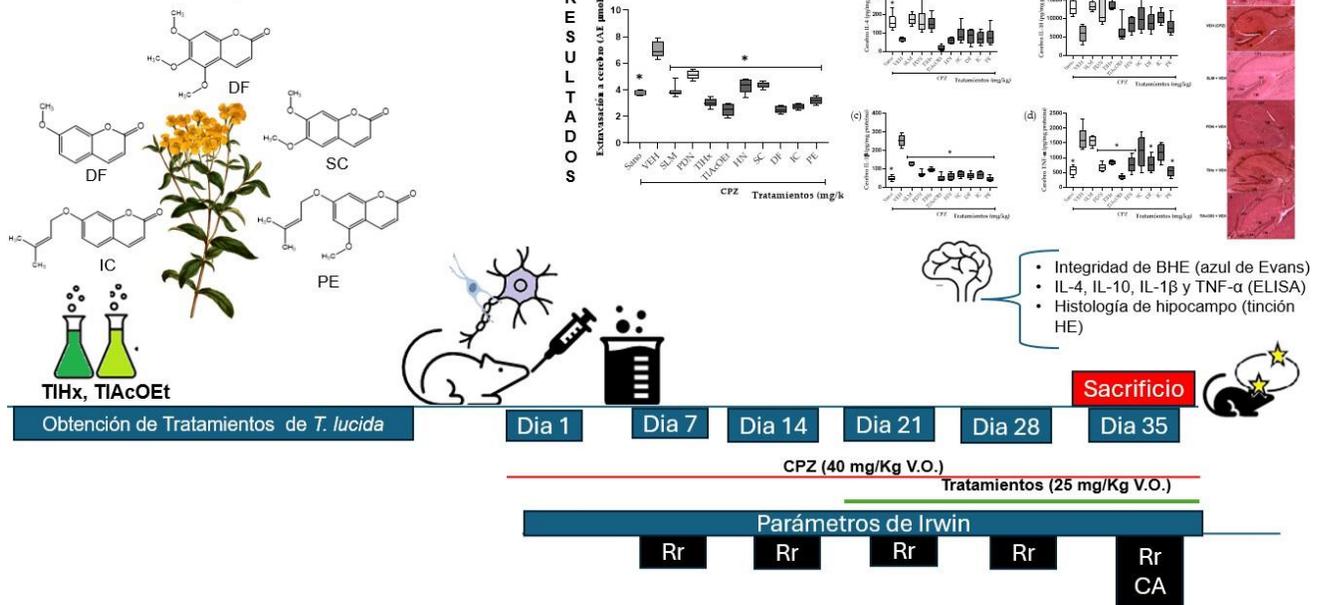
grupos metoxi y la presencia de isoprenilo en la posición C7 podrían ser determinantes para la eficacia biológica, subrayando la importancia de los sustituyentes en el desarrollo de agentes terapéuticos basados en metabolitos secundarios de plantas. Sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a estos potenciales efectos terapéuticos. Este estudio abre nuevas puertas para la investigación biomédica y ofrecer nuevas terapias para tratar enfermedades desmielinizantes, aprovechando los recursos naturales y minimizando los efectos secundarios asociados con los tratamientos convencionales.

10 CONCLUSIONES

- Las cumarinas identificadas en *T. lucida* (HN, SC, DF, IC y PE) presentan grupos funcionales que impactan en su actividad biológica. En particular, las cumarinas con múltiples grupos metoxi, como SC y DF, demostraron una mayor eficacia en la reducción de piloerección y amontonamiento, además de preservar la estructura del hipocampo, lo cual sugiere que los grupos metoxi contribuyen a su efecto neuroprotector.
- Las cumarinas con un grupo isoprenilo, como IC y PE, mostraron ser efectivas para mitigar el daño neurológico inducido por CPZ. En particular, PE registró los menores porcentajes de piloerección y una mejora en la conducta, lo cual indica que la presencia del grupo isoprenilo podría potenciar la actividad neuroprotectora y ansiolítica de las cumarinas, subrayando la relevancia de este grupo funcional.
- La comparación entre las cumarinas reveló que la ausencia de grupos metoxi, como en el caso de IC, reduce su eficacia en la protección contra la infiltración de células inflamatorias y la desmielinización en el hipocampo. Esto sugiere que los grupos metoxi desempeñan un papel esencial en la modulación de la actividad biológica de las cumarinas.
- La combinación de las cumarinas podría potenciar su efecto neuroantiinflamatorio, como lo sugieren los resultados observados en TIHx.
- Los extractos y cumarinas demostraron proteger a la BHE, sugiriendo que las cumarinas tienen la capacidad de penetrar la BHE y ejercer sus efectos neuroprotectores de manera efectiva. Este aspecto es crucial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas donde la integridad de la BHE está comprometida.

11 RESUMEN GRÁFICO

T. lucida: Efecto Neuroprotector e Inmunomodulador



12 PERSPECTIVA

Realizar un análisis cuantitativo del daño en el hipocampo; este análisis permitirá una evaluación detallada y precisa de la infiltración de células inflamatorias en el hipocampo, proporcionando datos cruciales para entender el alcance y la naturaleza del daño en esta región cerebral.

Realizar estudios *in silico*; para profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares mediante los cuales las cumarinas de *T. lucida* ejercen sus efectos neuroprotectores e inmunomoduladores. Este conocimiento puede conducir a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y al desarrollo de estrategias más efectivas para prevenir o tratar trastornos neuroinflamatorios y enfermedades autoinmunes.

13 REFERENCIAS

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, *37*(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Amin, S. N., Younan, S. M., Youssef, M. F., Rashed, L. A., & Mohamady, I. (2013). A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research*, *2*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-151.v1>
- Andrade, J. C., Monteiro, Á. B., Andrade, H. H. N., Gonzaga, T. K. S. N., Silva, P. R., Alves, D. N., Castro, R. D., Maia, M. S., Scotti, M. T., Sousa, D. P., & Almeida, R. N. (2021). *Involvement of GABA A Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal*. 2021.
- Anisha Doshi and Jeremy Chataway. (2017). Multiple Sclerosis, a treatable disease. *Clinical Medicine*, *17*(6), 530–536. <https://doi.org/https://doi.org/10.7861/clinmedicine.17-6-530>
- Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES*. (s/f).
- Baecher-allan, C., Kaskow, B. J., & Weiner, H. L. (2018). Review Multiple Sclerosis : Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, *97*(4), 742–768. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>
- Barthelmes, J., Tafferner, N., Kurz, J., de Bruin, N., Parnham, M. J., Geisslinger, G., & Schiffmann, S. (2016). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and evaluation of the disease-dependent distribution of immune cells in various tissues. *Journal of Visualized Experiments*, *2016*(111), 1–10. <https://doi.org/10.3791/53933>
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). *Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System*. <http://physrev.physiology.org>
- Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., & Medina Andrea, C. (2018). El hipocampo: historia, estructura y función. *TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río*, *5*(10).
- Berghoff, S. A., Düking, T., Spieth, L., Winchenbach, J., Stumpf, S. K., Gerndt, N., Kusch, K., Ruhwedel, T., Möbius, W., & Saher, G. (2017). Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model. *Acta neuropathologica communications*, *5*(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0497-6>
- Blaschek, A., Karenfort, M., Schimmel, M., Pritsch, M., Storm, K., Gravesande, V., Weber, M., Schmoeger, M., Seidl, R., Prayer, D., & Kornek, B. (2018). SC. *European Journal of Pediatric Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.08.003>
- Bonilla-Jaime, H., Guadarrama-Cruz, G., Alarcón-Aguilar, F. J., Limón-Morales, O., & Vázquez-Palacios, G. (2015). Antidepressant-like activity of *Tagetes lucida* Cav. is mediated by 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *Journal of Natural Medicines*, *69*(4), 463–470. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0909-5>
- Bubols, G. B., Vianna, D. da R., Medina-Remón, A., Poser, G. von, Lamuela-Raventos, R. M., Eifler-Lima, V. L., & Garcia, S. C. (2013). The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*, 318–334.

- Buttgereit, F., Doering, G., Schaeffl, A., Witte, S., Sierakowski, S., Gromnica-Ihle, E., Jeka, S., Krueger, K., Szechinski, J., & Alten, R. (s/f). Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. En *www.thelancet.com*. www.thelancet.com
- Capunzo, M., Brunetti, L., Cavallo, P., Boccia, G., Caro, F. D. E., & Ieluzzi, M. (2003). *Antimicrobial activity of dry extracts of Tagetes lucida from Guatemala. February 1997*, 85–87. <https://doi.org/10.13140/2.1.4247.6167>
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(6), 655–658. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>
- Castillo-Álvarez, F., & Marzo-Sola, M. E. (2017). Role of intestinal microbiota in the development of multiple sclerosis. *Neurología*, 32(3), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.07.010>
- Chaves, O. S., Teles, Y. C. F., De Oliveira Monteiro, M. M., Mendes Junior, L. D. G., De Fátima Agra, M., De Andrade Braga, V., Silva, T. M. S., & De Souza, M. D. F. V. (2017). Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoquinoline alkaloids. *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010094>
- Chesnokova, V., Pechnick, R. N., & Wawrowsky, K. (2016). Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. En *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 58, pp. 1–8). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.017>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- David, J., Hernández, O., Aguilar, E. J., & García-García, F. (2015). *El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje*. <https://www.researchgate.net/publication/282251666>
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M. T., & Vilella, E. (2007). Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology Letters*, 169(3), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.01.010>
- Gabriela, G. C., Javier, A. A. F., Elisa, V. A., Gonzalo, V. P., & Herlinda, B. J. (2012). Antidepressant-like effect of *Tagetes lucida* Cav. extract in rats: Involvement of the serotonergic system. *American Journal of Chinese Medicine*, 40(4), 753–768. <https://doi.org/10.1142/S0192415X12500565>
- García-Díaz, B., & Estivill-Torrús, G. (2008). Modelos de experimentación animal para la investigación en esclerosis múltiple. *Revista española de Esclerosis Múltiple*, 1 (May 2014), 5–18.
- Goldim, M. P. de S., Della Giustina, A., & Petronilho, F. (2019). Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Current Protocols in Immunology*, 126(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/cpim.83>
- González-Trujano, M. E., Gutiérrez-Valentino, C., Hernández-Arámburo, M. Y., Díaz-Reval, M. I., & Pellicer, F. (2019). Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the

antinociceptive activity of *Tagetes lucida* Cav. *Life Sciences*, 231(101), 116523.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.079>

- Guadarrama-Cruz, G., Alarcón-Aguilar, F. J., Lezama-Velasco, R., Vázquez-Palacios, G., & Bonilla-Jaime, H. (2008). Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.013>
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAR), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00073>
- Guo, H., Cao, H., Cui, X., Zheng, W., Wang, S., Yu, J., & Chen, Z. (2019). Silymarin's inhibition and treatment effects for Alzheimer's disease. *Molecules*, 24(9).
<https://doi.org/10.3390/molecules24091748>
- Guzmán Gutiérrez, S. L. G., Reyes Chilpa, R. R., & Bonilla Jaime, H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervous”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 591–608. <https://doi.org/10.1016/j.bjrp.2014.10.007>
- Heike Vibrans (ed.). (2009, julio 14). *Malezas de México/Tagetes lucida* Cav. *Pericón*.
- Hernández, T., Canales, M., Flores, C., García, A. M., Durán, A., & Ávila, J. G. (2006). Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 19–22.
<https://doi.org/10.1080/13880200500509157>
- Hernandez-Leon, A., & Narv, F. (2020). *Role of -Caryophyllene in the Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Tagetes lucida* Cav. *Essential Oil*.
- Honeycutt, S. E., & O'Brien, L. L. (2020). Injection of Evans blue dye to fluorescently label and image intact vasculature. *BioTechniques*, 70(3), 1–5. <https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0152>
- Kaddatz, H., Joost, S., Nedelcu, J., Chrzanowski, U., Schmitz, C., Gingele, S., Gudi, V., Stangel, M., Zhan, J., Santrau, E., Greiner, T., Frenz, J., Müller-Hilke, B., Müller, M., Amor, S., van der Valk, P., & Kipp, M. (2021). Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia*, 69(4), 925–942. <https://doi.org/10.1002/glia.23937>
- Kesterson, J. W., & Carlton, W. W. (1971). Monoamine oxidase inhibition and the activity of other oxidative enzymes in the brains of mice fed cuprizone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 20(3), 386–395. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(71\)90281-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(71)90281-X)
- Kopanitsa, M. V., Lehtimäki, K. K., Forsman, M., Suhonen, A., Koponen, J., Piipponiemi, T. O., Kärkkäinen, A. M., Pavlidi, P., Shatillo, A., Sweeney, P. J., Merenlender-Wagner, A., Kaye, J., Orbach, A., & Nummi, A. (2021). Cognitive disturbances in the cuprizone model of multiple sclerosis. *Genes, Brain and Behavior*, 20(1). <https://doi.org/10.1111/gbb.12663>
- Koutsouraki, E., Costa, V., & Baloyannis, S. (2010). Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: A Review. *International Review of Psychiatry*, 22(1), 2–13.
<https://doi.org/10.3109/09540261003589216>
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology*, 1916, 99–103.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9

- Krasselt, M., & Baerwald, C. (2016). Efficacy and safety of modified-release prednisone in patients with rheumatoid arthritis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1047–1058. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S87792>
- Kren, V., & Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 149(1), 29–41. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.002>
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. En *Cells* (Vol. 8, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
- Kurtzke, J. F. (1993). Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 382–427. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.4.382>
- LaMothe, R. A., Kolte, P. N., Vo, T., Ferrari, J. D., Gelsinger, T. C., Wong, J., Chan, V. T., Ahmed, S., Srinivasan, A., Deitemeyer, P., Maldonado, R. A., & Kishimoto, T. K. (2018). Tolerogenic nanoparticles induce antigen-specific regulatory T cells and provide therapeutic efficacy and transferrable tolerance against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00281>
- Leo, H., & Kipp, M. (2022). Remyelination in Multiple Sclerosis: Findings in the Cuprizone Model. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232416093>
- Liu, H., Huang, X., Xu, J., Mao, H., Li, Y., Ren, K., Ma, G., Xue, Q., Tao, H., Wu, S., & Wang, W. (2021). Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. *Neurobiology of Stress*, 15, 100417. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100417>
- Lubrich, C., Giesler, P., & Kipp, M. (2022). Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231911342>
- Macías-Cosme, K., Cervantes-Llanos, M., Marín-Prida, J., Falcón-Cama, V., Pentón-Arias, E., & Pentón-Rol, G. (2012). Generation of a murine chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis model for molecular pharmacology studies in multiple sclerosis. *Biotechnología Aplicada*, 29(3), 162–168.
- María Díaz Sánchez (2014). POLIMORFISMOS LINGO1 rs9652490 Y rs11856808 Y RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. *TESIS DOCTORAL*.
- Martínez Altarriba, M. C., Ramos-Campoy, O., Luna-Calcaño, I. M., & Arrieta-Antón, E. (2015). A review of multiple sclerosis (2). Diagnosis and treatment. *Semergen*, 41(6), 324–328. <https://doi.org/10.1016/j.semarg.2014.07.011>
- Mata-Pinzón, S., Pérez-Ortega, G., Reyes-Chilpa, R., Hobompich, I., & Roo, Q. (2018). Plantas Medicinales Para El Tratamiento Del Susto Y Mal De Ojo. Análisis De Sus Posibles Efectos Sobre El Sistema Nervioso Central Por Vía Transdérmica E Inhalatoria. *Revista Etnobiología*, 16, 30–47.

- Mathiasen, J. R., & Moser, V. C. (2018). The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents. *Current Protocols in Pharmacology*, 83(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/cpph.43>
- McPhetres, J., & Zickfeld, J. H. (2022). The physiological study of emotional piloerection: A systematic review and guide for future research. *International Journal of Psychophysiology*, 179(April), 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2022.06.010>
- Meca-Lallana, J. E., Hernández-Clares, R., & Carreón-Guarnizo, E. (2014). Tratamientos orales en esclerosis múltiple. *Medicina Clínica*, 143(S3), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(15\)30006-3](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(15)30006-3)
- Miller, S. D., Karpus, W. J., & Davidson, T. S. (2010). *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse*. 3, 1–26. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1501s77.Experimental>
- Monterrosas-Brisson, N., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., Bahena-Pérez, R., Avilés-flores, M., Fuentes-mata, M., Martínez-duncker, I., González-Cortázar, M., Avilés-flores, M., Fuentes-mata, M., & Martínez-Duncker, I. (2020). Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Natural Product Research*, 0(0), 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553172>
- Múltiple, Y. E., & Pacientes, E. N. (2013). *Instituto nacional de salud centro nacional de salud pública*. 2.
- Nave, K. A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. En *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 11, Número 4, pp. 275–283). <https://doi.org/10.1038/nrn2797>
- Pasquini, L. A., Calatayud, C. A., Bertone Uña, A. L., Millet, V., Pasquini, J. M., & Soto, E. F. (2007). The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochemical Research*, 32(2), 279–292. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9165-0>
- Peng, Y., Zhu, F. Z., Chen, Z. X., Zhou, J. X., Gan, L., Yang, S. S., Gao, S., & Liu, Q. Q. (2019). Characterization of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)35-55-specific CD8+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Chinese Medical Journal*, 132(24), 2934–2940. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000551>
- Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Brindis, F., Vibrans, H., & Reyes-Chilpa, R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.040>
- Perez-Rando, M., Penades-Gomiz, C., Martinez-Marin, P., García-Martí, G., Aguilar, E. J., Escarti, M. J., Grasa, E., Corripio, I., Sanjuan, J., & Nacher, J. (2023). Volume alterations of the hippocampus and amygdala in patients with schizophrenia and persistent auditory hallucinations. *Revista de Psiquiatria y Salud Mental*. <https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2023.05.002>
- Phelps, E. A. (2004). Human emotion and memory: Interactions of the amygdala and hippocampal complex. En *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 14, Número 2, pp. 198–202). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.015>

- Porras Dávila, S. L., González Cortázar, M., Jiménez Ferrer, E., Román Ramos, R., Bello Peralta, C., Martínez Hernández, B. G., Zamilpa, A., & Herrera Ruiz, M. (2022). Isolation, chemical characterization, and anti-inflammatory activity of coumarins, flavonoids, and terpenes from *Tagetes lucida*. *Natural Product Research*, 36(18), 4751–4756. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2005592>
- Porras-Dávila, S. L., Jiménez-Ferrer, E., Román Ramos, R., González-Cortázar, M., Almanza-Pérez, J. C., Herrera-Ruiz, M., & 1. (2022). Herniarin, Dimethylfraxetin and Extracts from *Tagetes lucida*, in Psychosis Secondary to Ketamine and Its Interaction with Haloperidol. *Plants*, 11(2789), 2–17.
- Prieto González, J. M. (2014). Tratamiento sintomático y del brote de esclerosis múltiple. *Medicina Clínica*, 143(S3), 39–43. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(15\)30009-9](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(15)30009-9)
- Redfern, W. S., Dymond, A., Strang, I., Storey, S., Grant, C., Marks, L., Barnard, C., Heys, C., Moyser, K., Greenwood, K., Cobey, D., Moore, N., Karp, N. A., & Prior, H. (2019). The functional observational battery and modified Irwin test as global neurobehavioral assessments in the rat: Pharmacological validation data and a comparison of methods. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106591>
- Joca SRL, Padovan CM, Guimarães FS. Estresse, depressão e hipocampo. *Braz J Psychiatry* [Internet]. 2003Dec;25:46–51. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000600011>
- Rincón-López, C., Tlapa-Pale, A., Medel-Matus, J.-S., Martínez-Quiroz, J., Rodríguez-Landa, J. F., & López-Meraz, M.-L. (2017). Interleukin-1 β increases neuronal death in the hippocampal dentate gyrus associated with status epilepticus in the developing rat. *Neurología (English Edition)*, 32(9), 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2016.03.006>
- Rocca, M. A., Barkhof, F., De Luca, J., Frisén, J., Geurts, J. J. G., Hulst, H. E., Sastre-Garriga, J., Filippi, M., Ciccarelli, O., De Stefano, N., Enzinger, C., Frederiksen, J. L., Gasperini, C., Kappos, L., Palace, J., Rovira, A., Vrenken, H., & Yousry, T. A. (2018). The hippocampus in multiple sclerosis. En *The Lancet Neurology* (Vol. 17, Número 10, pp. 918–926). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30309-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30309-0)
- Roosendaal, S. D., Hulst, H. E., Vrenken, H., Feenstra, H. E. M., Castelijns, J. A., Pouwels, P. J. W., Barkhof, F., & Geurts, J. J. G. (2010). Structural and functional hippocampal changes in multiple sclerosis patients with intact memory function. *Radiology*, 255(2), 595–604. <https://doi.org/10.1148/radiol.10091433>
- Salehi, B., Valussi, M., Flaviana Bezerra Morais-Braga, M., Nalyda Pereira Carneiro, J., Linkoln Alves Borges Leal, A., Douglas Melo Coutinho, H., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Cristina Cirone Silva, N., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S., & Sharifi-Rad, J. (2018). *Tagetes* spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. En *Molecules* (Vol. 23, Número 11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Sandra Torrades Oliva. (2004). *Esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes Factores de riesgo genético y ambientales Biología molecular*.

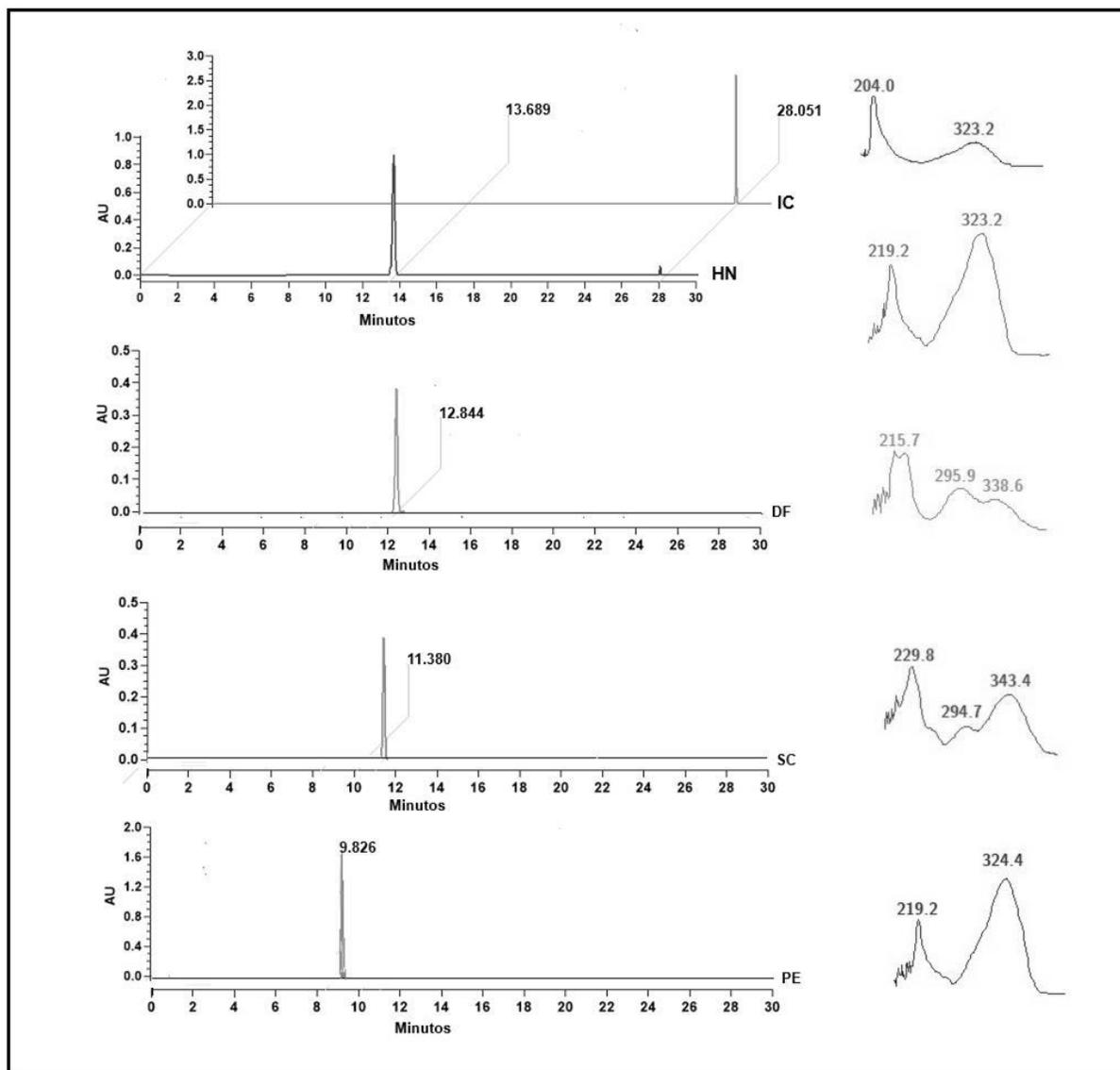
- Santibáñez, A., Herrera-Ruiz, M., González-Cortazar, M., Nicasio-Torres, P., Sharma, A., & Jiménez-Ferrer, E. (2022). Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Coumarins from *Tagetes lucida* in an LPS-Induced Neuroinflammation Model. *Plants*, *11*(21), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants11212805>
- Santibáñez, A., Herrera-Ruiz, M., González-Cortazar, M., Nicasio-Torres, P., Sharma, A., & Jiménez-Ferrer, E. (2023). Dose-Effect Determination of a Neuroprotector Fraction Standardized in Coumarins of *Tagetes lucida* and Bioavailability. *Pharmaceutics*, *15*(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030967>
- Savransky, A., De Pedriatía, H., & Garrahan, J. P. (2018). ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES. *Buenos Aires*, *78*, 75–81.
- Schropp, V., Rohde, J., Rovituso, D. M., Jabari, S., Bharti, R., & Kuerten, S. (2019). Contribution of LTi and TH17 cells to B cell aggregate formation in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1500-x>
- Sen, M. K., Mahns, D. A., Coorssen, J. R., & Shortland, P. J. (2022). The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. En *GLIA* (Vol. 70, Número 7, pp. 1215–1250). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.24148>
- Sierra Carrillo, D. (2000). “*El yauhtli o pericon, planta curativa y protectora: su importancia mágico-religiosa en el presente y en el pasado*”. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Silvestroff, L., Bartucci, S., Soto, E., Gallo, V., Pasquini, J., & Franco, P. (2010). Cuprizone-Induced demyelination in CNP::GFP transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology*, *518*(12), 2261–2283. <https://doi.org/10.1002/cne.22330>
- Simón, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1094). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. En *Behavioural Brain Research* (Vol. 61).
- Slavin, A., Ewing, C., Liu, J., Ichikawa, M., Slavin, J., & Bernard, C. C. A. (1998). Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Autoimmunity*, *28*(2), 109–120. <https://doi.org/10.3109/08916939809003872>
- Suzuki, K. (1969). Giant hepatic mitochondria: Production in mice fed with cuprizone. *Science*, *163*(3862), 81–82. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.81>
- Terry, R. L., Ifergan, I., & Miller, S. D. (2017). *HHS Public Access*. *7*, 145–160. <https://doi.org/10.1007/7651>
- Terry, R. L., Ifergan, Igal., & Miller, S. D. (2016). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Methods Mol Biol*, *1304*, 145–160. https://doi.org/10.1007/7651_2014_88.
- Torkildsen, Brunborg, L. A., Myhr, K. M., & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*, *117*(SUPPL. 188), 72–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x>

- Torre-Fuentes, L., Moreno-Jiménez, L., Pytel, V., Matías-Guiu, J. A., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2019). Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurología*, 35(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2019.03.007>
- Vannson, J. L., & Gaudron, M. (s/f). *The Human Hippocampus 123 Henri Duvernoy Françoise Cattin Pierre-Yves Risold Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI Fourth Edition Drawings and Illustrations by.*
- Villaseñor Ríos, J. L., & García, F. J. E. (1998). *Catálogo de malezas de México* (Universidad Nacional Autónoma de México, Ed.).
- Von Gunten, A., Kövari, E., Rivara, C. B., Bouras, C., Hof, P. R., & Giannakopoulos, P. (2005). Stereologic analysis of hippocampal Alzheimer's disease pathology in the oldest-old: Evidence for sparing of the entorhinal cortex and CA1 field. *Experimental Neurology*, 193(1), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.12.005>
- Voskuhl, R. R., Sawalha, A. H., & Itoh, Y. (2018). Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Multiple Sclerosis*, 24(1), 22–31. <https://doi.org/10.1177/1352458517737394>
- Wadhwa, K., Pahwa, R., Kumar, M., Kumar, S., Sharma, P. C., Singh, G., Verma, R., Mittal, V., Singh, I., Kaushik, D., & Jeandet, P. (2022). Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin. En *Molecules* (Vol. 27, Número 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>
- Wan, C., Wei, Y., Ma, J., & Geng, X. (2018). Protective effects of scopolamine against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Molecular Medicine Reports*, 18(2), 1752–1760. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9123>
- Wang, X., Chang, L., Wan, X., Tan, Y., Qu, Y., Shan, J., Yang, Y., Ma, L., & Hashimoto, K. (2022). (R)-ketamine ameliorates demyelination and facilitates remyelination in cuprizone-treated mice: A role of gut–microbiota–brain axis. *Neurobiology of Disease*, 165(January). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105635>
- Wootla, B., Eriguchi, M., & Rodriguez, M. (2012). Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.1155/2012/969657>
- Zhan, J., Mann, T., Joost, S., Behrangi, N., Frank, M., & Kipp, M. (2020). The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040843>
- Zhu, X., Yao, Y., Hu, Y., Yang, J., Zhang, C., He, Y., Zhang, A., Liu, X., Zhang, C., & Gan, G. (2021). Valproic acid suppresses cuprizone-induced hippocampal demyelination and anxiety-like behavior by promoting cholesterol biosynthesis. *Neurobiology of Disease*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105489>
- Zirngibl, M., Assinck, P., Sizov, A., Caprariello, A. V., & Plemel, J. R. (2022). Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00538-8>

Zohara Sternberg. (2012). Sympathetic Nervous System Dysfunction in Multiple Sclerosis, Linking Neurodegeneration to a Reduced Response to Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 18(12), 1635–1644. <https://doi.org/10.2174/138161212799958639>

14 ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas y espectros UV de: IC, HN, DF, SC y PE





Effects of Five Coumarins and Standardized Extracts from *Tagetes lucida* Cav. on Motor Impairment and Neuroinflammation Induced with Cuprizone

Gabriela Castro-Martínez ^{1,2} , Maribel Herrera-Ruiz ² , Manases González-Cortázar ² ,
Sandra Liliana Porras-Dávila ² , Julio Cesar Almanza Pérez ^{3,*} and Enrique Jimenez-Ferrer ^{2,*}

¹ Doctorate in Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University, Mexico City 14387, Mexico; gcm_19@hotmail.com

² Southern Biomedical Research Center, Mexican Social Security Institute, Guadalajara 44340, Mexico; cibus_herj@yahoo.com.mx (M.H.-R.); gmanases2000@gmail.com (M.G.-C.); davilasp1117@gmail.com (S.L.P.-D.)

³ Department of Health Sciences, Division of Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

* Correspondence: jcap@xanum.uam.mx (J.C.A.P.); enriqueferrer_mx@yahoo.com (E.J.-F.)

Abstract: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) with no curative treatment, and the available therapies aim to modify the course of the disease. It has been demonstrated that extracts of *Tagetes lucida* have immunomodulatory and neuroprotective effects. This work induced motor damage and neuroinflammation in male BALB/c mice by oral administration of cuprizone (CPZ) (40 mg/kg) for five weeks. In addition, the extracts and coumarins of *Tagetes lucida* (25 mg/kg) were used to control these damage variables; during the experiment, animals were subject to behavioral tests, and at the end of 5 weeks, mice from each group were used to measure the integrity of biological barriers (brain, kidneys, and spleen) through the extravasation test with blue Evans dye. In another group of animals, the ELISA method measured the brain concentrations of IL-1 β , IL-4, IL-10, and TNF- α . The results presented here allow us to conclude that the extracts and coumarins IC, HN, PE, DF, and SC of *Tagetes lucida* exert a neuroprotective effect by controlling the motor damage and neuroinflammation by increasing the expression of IL-4 and IL-10 and decreasing IL-1 β and TNF- α ; notably, these treatments also protect organs from vascular permeability increase, mainly the BBB, in mice with CPZ-induced experimental encephalomyelitis (VEH * $p < 0.05$). However, more studies must be carried out to elucidate the molecular mechanisms of the pharmacological effects of this Mexican medicinal plant.

Keywords: multiple sclerosis; cytokines; 7-Isoprenyloxycoumarin; (IC); herniarin; (HN); 7-O-Prenylscopoletin; (PE); dimethylfraxetin; (DF); scopolone (SC)



Citation: Castro-Martínez, G.; Herrera-Ruiz, M.; González-Cortázar, M.; Porras-Dávila, S.L.; Almanza Pérez, J.C.; Jimenez-Ferrer, E. Effects of Five Coumarins and Standardized Extracts from *Tagetes lucida* Cav. on Motor Impairment and Neuroinflammation Induced with Cuprizone. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1391. <https://doi.org/10.3390/ph16101391>

Academic Editor: Carlos Alberto Manssour Fraga

Received: 29 August 2023

Revised: 23 September 2023

Accepted: 25 September 2023

Published: 30 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS), characterized by inflammation and neurodegeneration associated with the demyelination of neurons [1,2]. Myelin is produced by oligodendrocytes, resident cells of the CNS, where a single oligodendrocyte can myelinate up to 80 axon segments to facilitate axonal signaling [3].

MS is mediated by altering the immune response in genetically predisposed individuals [2,4]. This alteration is characterized by multiple focal lesions that affect the CNS myelin sheaths and generate a series of clinical symptoms caused mainly by the neuroinflammatory and demyelinating process, which leads to axon damage [5]. The etiology of MS is unknown; however, epidemiological data indicate that genetic and environmental factors such as virus infections (Epstein–Barr), smoking, vitamin D deficiency, latitude, and a high

body mass index could influence the development and progression of the disease [2,4,6]. MS is a disabling neurological disease acquired in children, adolescents, and adults and is diagnosed by magnetic resonance imaging (MRI). MS generates psychological, economic, and social problems, affecting approximately 2.5 million people worldwide [4,7–9]. Its clinical manifestations begin in the third and fourth decades of life. It develops preferably in women, with a female/male ratio of 3:1 [8,10]. In terms of the clinical course, there are several MS subtypes: relapsing-remitting (RR), with relapses of disease separated by periods without clinical progression; secondary progressive (SP), which represents the phase of the disease when a gradual neurological deterioration (progression) follows a period of RR disease; primary progressive (PP), affecting approximately 15% of people with MS in whom the neurological deterioration is present from the onset; and the progressive-remitting (PR) subtype in which a few acute exacerbations are superimposed on the gradual PP-like course and which is considered the less frequent subtype of MS [7]. MS develops from infiltrating autoreactive T cells and other immune system cells through the blood–brain barrier (BBB) into the CNS, causing significant damage [1,10–12]. Four critical pathological features of MS have been described. (a) Inflammation is generally believed to be the main trigger of events leading to CNS damage, although it has recently been suggested that initial damage to neuroglial elements may trigger secondary inflammation in some cases. (b) Demyelination, the hallmark of MS, is where the inflammatory process destroys the myelin sheath or oligodendrocyte cell body. (c) Axonal loss or damage is the third feature and the fourth (d) is gliosis, an astrocytic reaction due to damage to the CNS [7,11]. MS is a highly complex disease due to the variety of clinical pictures that can occur depending on the area of the CNS that is affected, whether it is the brain or the spinal cord, and which are specific to each patient, depending on the individual's particular set of motor, sensory or cognitive disorders [2]. Although MS is a disease that only affects humans, the search for new pharmacological treatments has led to the development of animal models, both in vitro and in vivo, which attempt to reproduce some of the clinical manifestations of the disease. Within the in vivo models, we find the cuprizone (CPZ)-induced intoxication model. It has been shown that this compound is capable of causing temporary demyelination and reproducing some manifestations in mice similar to those that occur in the clinic in human patients [13,14]. CPZ (Bis(ciclohexanona)oxaldihidrazona) is a copper chelator that induces apoptosis of oligodendrocytes (cells that produce myelin) during its administration, which leads to demyelination of different brain areas such as the corpus callosum, hippocampus, basal ganglia, and cerebellum [3,14,15]. This demyelination initiates motor disability and an exacerbated accumulation of microglia and astrogliosis that promotes an inflammatory response within the first three weeks of CPZ feeding [3,14,16]. The CPZ model widely reported in the literature consists of the administration of 0.2% CPZ mixed with powdered food for rodents for 5 to 6 weeks, thus generating acute demyelination, or for 12 weeks for chronic demyelination [14]. There is currently no curative treatment for MS [11]. Instead, the available therapies aim to modify the disease's course and control its symptoms, controlling episodes of neuroinflammation [1,6].

Therefore, it is necessary to research new therapeutic alternatives that are safe and effective. Several plants that have been essential instruments of traditional medicine in different pathologies are now being used as new alternatives. *Tagetes lucida* “pericón” taxonomically belongs to the Asteraceae family; it is a plant used in traditional medicine to treat gastrointestinal problems involving colic, ulcers, diarrhea, dysentery, indigestion, vomiting, typhoid fever, and urogenital problems. Additional conditions treated include rheumatic pain, asthma, varicose veins, inflammation, abortion, carminative activity, anthelmintic infection, musculoskeletal pain, and neurological and inflammatory diseases [17–19]. In addition, *Tagetes lucida* (*T. lucida*) has been used for the treatment of emotional and nervous disorders as part of a mixture with other anxiolytic plants, disorders characterized by a “state of physical and mental restlessness” capable of diminishing the ability to achieve daily goals [18,20–22]. Recent studies have shown great interest in the basic research and application of *T. lucida*, and several authors have demonstrated the biological activity of this

species in different diseases. Pharmacological studies on the use of *T. lucida* have indicated antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties, and in addition to influencing the activity of the CNS, this species is useful as an antinociceptive, antidepressant, anxiolytic antipsychotic, and sedative [14–16,18,20–25].

This work aimed to evaluate the effect of standardized extracts and coumarins obtained from *T. lucida* in a model of chemically induced MS involving the chronic administration of cuprizone in BALB/c mice and quantifying neurological behavior with the Irwin test, motor impairment, neuroinflammation (IL-1 β , TNF- α , IL-4, and IL-10), and vascular permeability in different organs (brain, kidneys, spleen).

2. Results

2.1. Quantification and Chemical Identification of Five Coumarins

High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to investigate the extracts obtained using hexane (TlHx) and ethyl acetate (TlAcOEt) and identify different compounds. Figure 1 is a chromatogram that compares the two extracts at a wavelength of 330 nm. The results revealed the presence of five coumarins that correspond, according to their retention times (RT) and UV spectra, to 7-Isoprenyloxycoumarin (IC) with an RT of 27.29 min (λ = 204.0, 322.0 nm), herniarin (HN) with an RT of 12.25 min (λ = 219.2, 322.0 nm), dimethylfraxetine (DF) with a 11.75 min RT (λ = 215.7, 294.7, 335.3 nm), scoporone (SC) with an RT of 10.37 min (λ = 229.7, 294.8, 343.4 nm) and 7-O-prenylscopoletin (PE) with an RT of 9.54 min (λ = 219.7, 324.4 nm). These compounds were analyzed by ^1H , and ^{13}C NMR and the data were compared against standards and those described in the literature (Supplementary Data) [22].

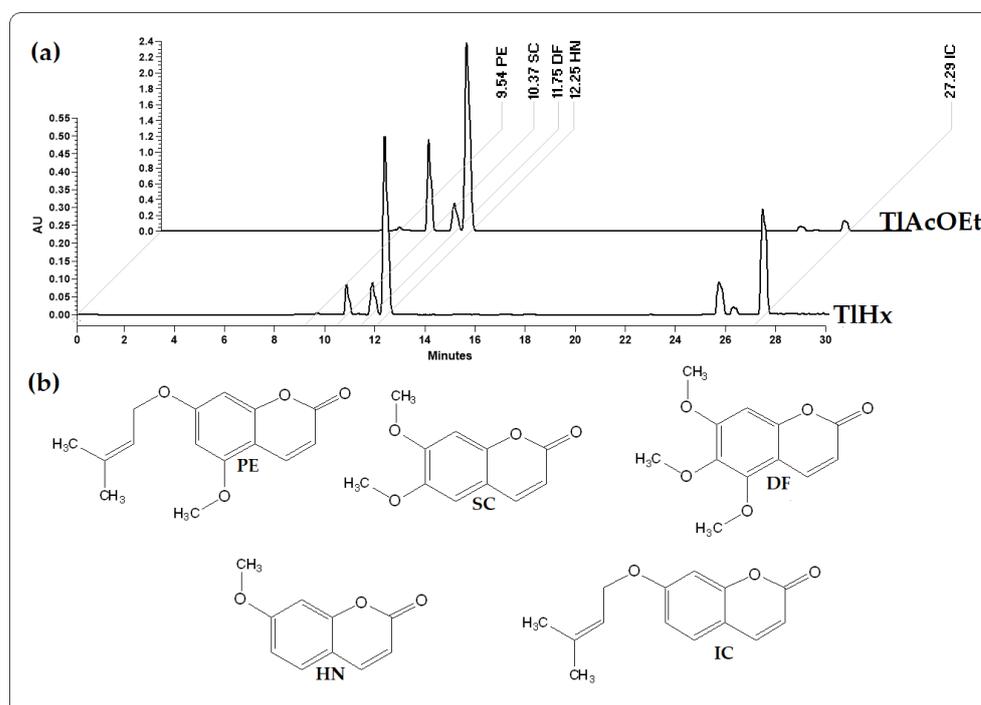


Figure 1. Chromatograms from HPLC analysis: (a) extracts from *T. lucida*, TlHx and TlAcOEt, at 330 nm; (b) chemical structures of 7-O-Prenylscopoletin (PE), Scoporone (SC), Dimethylfraxetin (DF), Herniarin (HN), and 7-Isoprenyloxycoumarin (IC).

The identified compounds (in $\mu\text{g}/\text{mg}$ of extract) were quantified using data from the standard curve of each compound in HPLC. Table 1 shows the concentrations of each coumarin. As shown in Figure 1, the size of the peaks of each compound is different in each extract, which was verified with the quantification, with 7-Isoprenyloxycoumarin (IC) being more concentrated in the less polar extract (TlHx). At the same time, Herniarin (HN),

Dimethylfraxetin (DF), Scoporone (SC), and 7-O-prenylscopoletin (PE) are found in higher concentrations in TlAcOEt. It should be noted that in both extracts, the SC is the most concentrated coumarin.

Table 1. Concentrations of five coumarins isolated from *T. lucida*, in two extracts.

Extract	IC (µg/mg)	HN (µg/mg)	DF (µg/mg)	SC (µg/mg)	PE (µg/mg)
TIHx	40.1	79.9	19.9	15,528.4	0.1
TlAcOEt	18.1	381.9	75.3	230,692.7	3.05

7-Isoprenyloxy coumarin (IC), herniarin (HN), Dimethylfraxetin (DF), Scoporone (SC) and 7-O-prenylscopoletin (PE).

2.2. Behavioral Tests

2.2.1. The Irwin Test

The animals were observed for five weeks, noting the Irwin parameters. Table 2 shows the percentage of mice that presented piloerection in each group. No changes occurred in any groups in the first week of CPZ administration.

Table 2. Relative piloerection (%) observed during the Irwin test.

Week	Healthy	VEH	SLM	PDN	TIHx	TlAcOEt	DF	PE	IC	HN	SC
		Cuprizone									
1	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O
2	N/O	20 *	13 *	15 *	27 *	20 *	7 *	N/O	13 *	20 *	27 *
3	N/O	53 *	40 *	37 *	27 *	47 *	27 *	40 *	33 *	33 *	20 *
4	N/O	93 *	73 *	40 *	27 *	33 *	13 *	33 *	40 *	27 *	13 *
5	N/O	93 *	60 *	26 *	20 *	20 *	20 *	7 *	13 *	20 *	6 *

Vehicle (VEH), silemarin, (SLM), Prednisone (PDN), dimethylfraxetin (DF), 7-O-prenylscopoletin (PE), 7-Isoprenyloxy coumarin (IC), herniarin (HN), and scoporone (SC). N/O = no observed. Data were analyzed with χ^2 test ($n = 15$). * indicates a significant difference at $p < 0.05$, comparing all treatments with respect to time in weeks of exposure to cuprizone.

In the second week with CPZ, 20% of the VEH group already had piloerection; subsequently, the number of animals that presented this symptom increased over time so that by the fourth and fifth weeks, there were already 93% of individuals presenting symptoms. In the group that received silymarin (SLM), it was also observed that the percentage of individuals with piloerection was higher over time. However, the drug prevented the value from being higher than that of the VEH group. By the fifth week, only 60% of mice presented piloerection. Prednisone (PDN), an anti-inflammatory steroid, also prevented piloerection elevation in the mice, compared with VEH, and by the fifth week, the percentage was 26%. TIHx or TlAcOEt caused a lower percentage of animals to bristle compared with the VEH group from the third week of treatment, and by the end of the experiment (fifth week), it was observed in only 20% of mice in each group. All coumarin compounds resulted in significant protection against piloerection throughout the five weeks. The group that received PE did not present piloerection in the second week and up to the third week, with a percentage of 40% that decreased until the fifth week when only 6% of individuals showed the symptom.

Moreover, SC also protected the mice, and already in the last week, the same percentage of only 6% presented piloerection. Another parameter observed during the Irwin test was piling (Table 3), which was present from the first week in all the groups analyzed, except in healthy animals. The percentage of individuals who presented crowding behavior due to the administration of CPZ in the VEH group gradually increased until reaching 100% in the fifth week. The administration of SLM or PDN caused the animals to avoid crowding for five weeks during the experiment. A high percentage of animals showed crowding behavior, but in the end, only 20% of individuals presented this behavior. The animals in the groups that received one of the *T. lucida* treatments all avoided crowding, a

large decrease compared with the behavior caused by the CPZ without treatment. It should be noted that, mainly in the fifth week, TIACoEt, PE, and DF did not cause any of the mice in these groups to present this behavior.

Table 3. Relative crowding behavior (%) of mice exposed to different treatments during the Irwin test.

Week	Healthy	Cuprizone									
		VEH	SLM	PDN	TIHx	TIACoEt	DF	PE	IC	HN	SC
1	N/O	27 *	33 *	20 *	20 *	13 *	27 *	13 *	40 *	33 *	20 *
2	N/O	33 *	33 *	37 *	27 *	27 *	40 *	60 *	47 *	47 *	40 *
3	N/O	87 *	53 *	40 *	27 *	40 *	33 *	53 *	33 *	40 *	33 *
4	N/O	87 *	33 *	28 *	20 *	33 *	20 *	40 *	27 *	27 *	20 *
5	N/O	100 *	20 *	20 *	13 *	N/O	N/O	N/O	13 *	13 *	13 *

Vehicle (VEH), silemarine, (SLM), Prednisone (PDN), dimethylfraxetine (DF), 7-O-prenylscopoletin (PE), 7-Isoprenyloxy coumarin (IC), herniarin (HN), and scoporone (SC). N/O = no observed. Data were analyzed with χ^2 test (n = 15). * indicates a significant difference when $p < 0.05$, comparing all treatments with respect to time in weeks of exposure to cuprizone.

2.2.2. Open Field Test (OFT)

The CPZ caused a significant increase in the total crossings in the open field (Figure 2a), in the number of crossings in the periphery (Figure 2c), in grooming (Figure 2d), in rearing (Figure 2e), and in the frequency of stool (Figure 2f); additionally, this compound provoked a significant decrease in the number of crosses in the center (Figure 2b) when compared with the group of healthy animals ($* p < 0.05$). All the treatments administered, including the control drugs (SLM and PDN) and the *T. lucida* products, significantly decreased the number of total crossings and increased the crossings to the center compared with VEH ($* p < 0.05$), except HN and DF, which did not affect the total crossovers ($p > 0.05$) and PE, which did not show significant changes in the number crossovers in the center in comparison with VEH (Figure 2a,b).

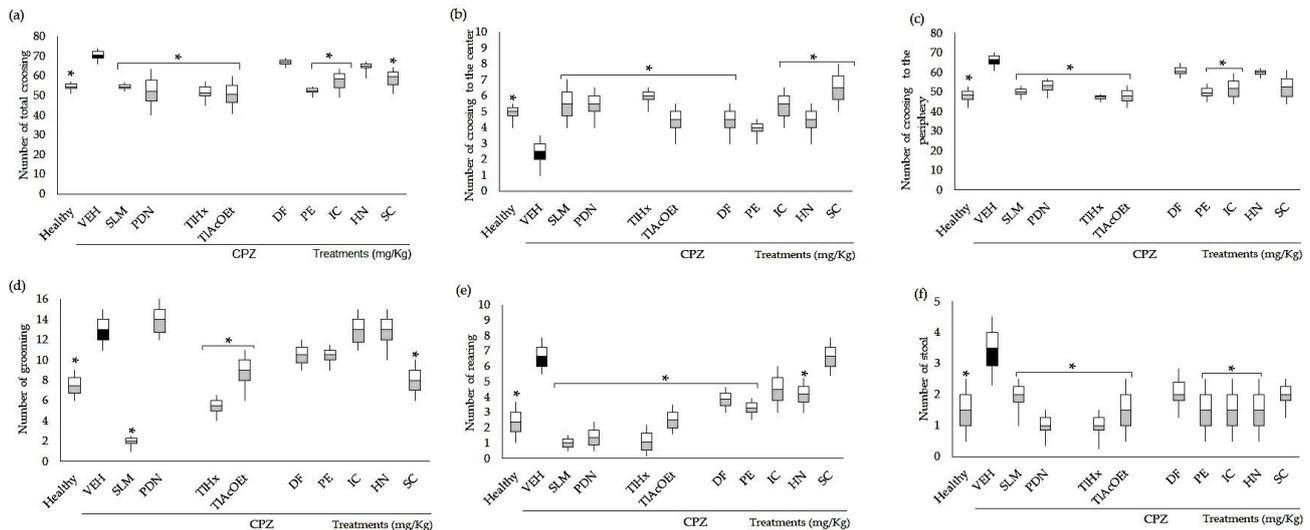


Figure 2. Effect of *T. lucida* in the open field test on BALB/c mice administered with CPZ at the end of week five. (a) Number of total crossings. (b) Number of crossings to the center. (c) Number of crossings to the periphery. (d) Number of grooming behaviors. (e) Number of rearing behaviors. (f) Number of stools. Data were analyzed with ANOVA followed by Dunnett’s test (mean \pm SD n = 8), and the difference was considered significant when $* p < 0.05$ in comparison with the VEH group.

Considering the number of crossings to the periphery, the standard drugs, the extracts TIHx and TIACoEt, and the coumarins IC and PE significantly reduced the number of events caused by the CPZ ($* p < 0.05$, Figure 2c). At the same time, mice treated with

HN, DF, and SC did not change this behavior in the OFT. Parameters associated with a behavioral disturbance in mice exposed to a stressful environment, such as grooming, rearing, and stool, were modified in different ways compared with VEH. Thus, the number of grooming behaviors was significantly decreased with the administration of SLM, TIHx, TlAcOEt, and SC ($* p < 0.05$, Figure 2d). SLM, PDN, TIHx, TlAcOEt, DF, HN, and PE, decreased the rearing and stool when data were compared with the VEH group ($* p < 0.05$, Figure 2e,f). However, DF only actively reduced the rearing, and SC did not modify these two variables ($p > 0.05$).

2.2.3. Rota-Rod Test (Rr)

In the present study, the Rr test indicated a deficit in motor activity (gross motor skills) in the VEH group, as in the Franco-Pons test. Figure 3 shows the area under the curve (AUC) of residence time for the data obtained during the five experimental weeks. The animals were evaluated in their motor coordination behavior in the Rr test at 4, 12, 20, 28, and 36 rpm; the data of 4 and 12 rpm do not show significant changes in comparison with VEH (VEH $p > 0.05$). The deterioration in motor coordination caused by CPZ was observed starting at 20 rpm and continued up to 28 and 36 rpm (Figure 3a–c), with a significant difference between the healthy and VEH groups ($* p < 0.05$). However, as can be seen in Figure 3, all the groups of animals treated with SLM, PDN, TIHx, TlAcOEt, and coumarins showed reduced damage, all of them being statistically different from VEH ($* p < 0.05$), except SC at 28 rpm and SLM at 36 rpm, which only showed a tendency for increased AUC without being different from the VEH values.

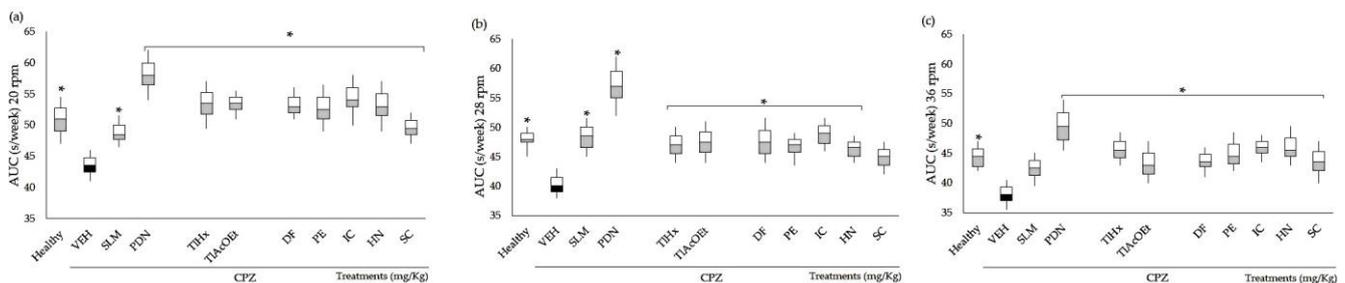


Figure 3. AUC of motor coordination of mice BALB/c administered with CPZ for five weeks and exposed to the rota-rod (Rr) test. Three different speeds: (a) 20 rpm, (b) 28 rpm, and (c) 36 rpm. Data are presented as mean \pm SD, with $n = 8$, $* p < 0.05$ indicates significant differences between groups in comparison with the VEH group, by using ANOVA with the post-test of Tukey.

2.3. Effect of Extracts and Coumarins from *T. lucida* on Vascular Permeability

CPZ caused a significant increase in the concentration of Evans blue (EB) extravasated in the brain, spleen, and kidneys, in comparison with the group of healthy animals ($* p < 0.05$), which indicates an increase in the permeability of the capillary system of each organ, and the BBB in the case of the brain. This effect was significantly controlled downward in almost all organs by all *T. lucida* treatments and control drugs, and the data are different from the VEH results (Figure 4, $* p < 0.05$); however, there were some exceptions; for example, neither SLM, TIHx, HN, nor SC could control extravasation in the spleen. At the same time, in the kidneys, HN was significantly different from that of the VEH group, but because it increases the permeability of these organs even more (Figure 4c,d; $* p < 0.05$).

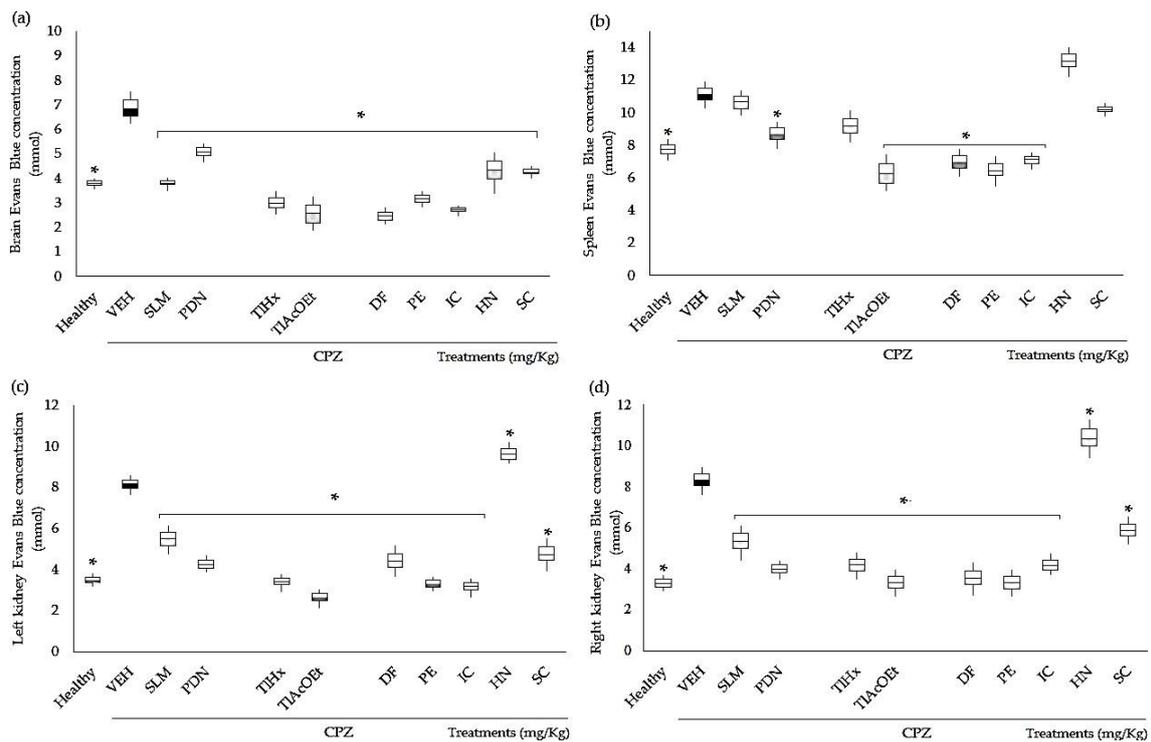


Figure 4. Effect of extracts and coumarins from *T. lucida* on vascular permeability in the brain, the kidneys, and the spleen from mice with CPZ treatment. Optical density was measured at 630 nm, and the measurements were converted into μmol of dye extravasated using the EB extinction coefficient $\epsilon = 7.81 \times 10^4$. (a) Brain, (b) spleen, (c) left kidney, and (d) right kidney. Data are presented as mean \pm SD, with $n = 4$, * $p < 0.05$ indicates significant differences between groups compared with the VEH group using the Student *t*-test.

2.4. Effect of Extracts and Coumarins from *T. lucida* on Cytokine Concentrations

The inflammation associated with the chronic administration of CPZ was quantified by measuring the concentrations of anti- and pro-inflammatory cytokines (Figure 5). CPZ caused a decrease in the concentration of IL-4 and IL-10 in the brains of mice, whereas increases in TNF- α and IL-1 β were observed. All data were statistically different from the group of healthy animals (* $p < 0.05$). The drugs used as the positive control, SLM and PDN, increased the value of IL-4 in the brain, while for IL-10, only SLM induced a significant change compared with VEH (* $p < 0.05$), and PDN only showed a trend. Although not significantly different from the damage group ($p > 0.05$), both treatments decreased IL-1 β brain concentrations, and for TNF- α , only PDN modified the effect of CPZ (* $p < 0.05$).

TIHx was the only treatment from *T. lucida* that induced a significant change compared with VEH (* $p < 0.05$) and increased the concentrations of IL-4 and L-10 in the brain. All treatments from *T. lucida* inhibited increases in IL-1 β in the brains of the animals, with values that were significantly different from VEH (* $p < 0.05$). For TNF- α , a similar pattern was observed, with the levels of this pro-inflammatory cytokine decreasing (* $p < 0.05$), except for the animals that received IC and SC.

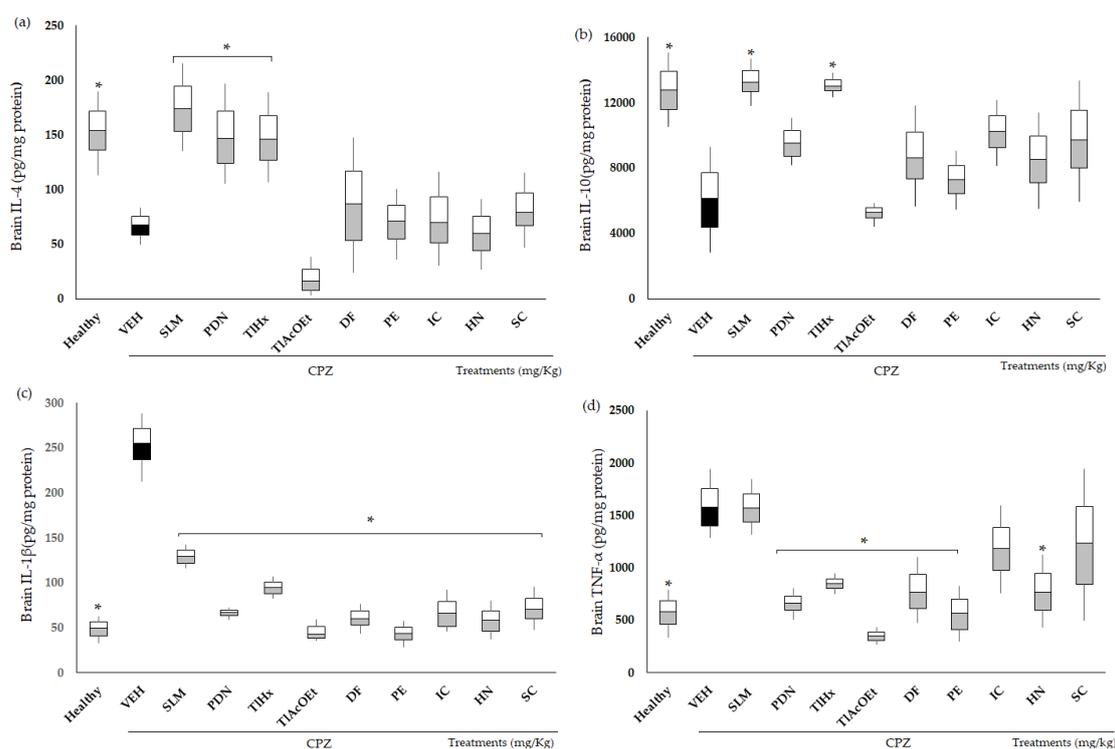


Figure 5. Effect of extracts and coumarins from *T. lucida* on the concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain. (a) IL-4, (b) IL-10, (c) IL-1 β , and (d) TNF- α . Data are presented as mean \pm SD, with $n = 6$, * $p < 0.05$ indicates significant differences between groups compared with the VEH group, using ANOVA followed by Tukey Test. SLM = silymarin, PDN = prednisone.

3. Discussion

3.1. Quantification and Chemical Identification of Five Coumarins

Recent research has shown that different extracts of *T. lucida* have properties such as anti-inflammatory and antioxidant activities and mainly have a potential use against illnesses related to the CNS, providing antinociceptive and sedative effects, and treatment for disorders of depression and anxiety [17–19,21,23,25–29]. The HPLC analysis of the TIHx and TlAcOEt extracts allowed the identification of five coumarins with biological activity: IC, HN, DF, SC, and PE. These coumarins have already been reported for other species besides *T. lucida* [30], although IC and PE have only been identified in this last species [25]. This group of secondary metabolites (coumarins) comprises great diversity; the union of different functional groups forms the basic skeleton of coumarin (2H-chromen-2-one) [31]. Pharmacological studies of these coumarins have demonstrated their potential therapeutic use for CNS diseases as they are considered anti-neuroinflammatory compounds [25,26]. A pharmacokinetic study of a mixture of five coumarins (IC, HN, DF, SC, and PE), administered by the oral pathway (10 mg/kg), was conducted to measure the bioavailability of these compounds as neuroprotectives. The concentration was quantified by an HPLC-DAD-UV method in samples of plasma, brain, kidney, and spleen from healthy mice and animals with neuroinflammation secondary to the administration of LPS. The results showed an increase in the plasma concentration of coumarins up to three times in the group with neuroinflammation compared with the healthy control group. The same was observed in the quantification of coumarins in the brain, thus demonstrating the ability of these compounds to cross the BBB, suggesting this as an alternative treatment for diseases associated with neuroinflammation processes [32].

3.2. Evaluation of Two Extracts and Five Coumarins against the Motor Damage Induced by CPZ

The model of chronic and forced administration (per os, p.o.) of cuprizone (CPZ) was used to assess the effect of TLHx, TlAcOEt and the five coumarins on motor damage, BBB permeability, and neuroinflammation.

The data available in the literature on the CPZ model indicate that the animals consume this substance in their daily diet. However, in the present work, a scheme of forced administration (p.o.) of the toxicant was proposed, which ensures that the administered dose is exact. Thus, the application route is the main difference between this design and those proposed by other researchers [33].

3.3. Behavioral Tests

Animals with (sick) or without (healthy) CPZ and animals with damage and subjected various treatments were subjected to different behavioral tests: Irwin test, OFT, and Rr. The Irwin Test is used to evaluate, through observation, behavioral changes or physiological manifestations that allow us to study the effects of substances on the CNS, from doses without observable effects to doses that could induce toxicity [34]. During the Irwin Test, it was observed that the CPZ caused physiological changes such as piloerection and crowding behavior, and these increased over time. It has been established that piloerection is a response of mice exposed to stressful environments. It is regulated by activation of the sympathetic nervous system through physiological mechanisms such as thermoregulation, increased heart rate, increased blood pressure, muscle tone, and excessive sweating. It is caused mainly by different stimuli, such as sadness, fear, pain, threat, and anxiety [35,36]. The pathophysiological frame of EM is derived from the administration of CPZ; this toxin has a stimulant effect, which activates the CNS, causing piloerection secondary to the alteration of the sympathetic nervous system and also causing the overcrowding behavior of the animals. Mice's snuggling behavior may stem from an attempt to regulate temperature through the social attachment they display in this behavior. The groups treated with *T. lucida* had similar behaviors to the healthy animals since piloerection and curling up occurred at a low percentage compared with the healthy group.

In addition to these results, it was observed that CPZ can cause motor damage associated with the demyelination that it induces. It is probable that CPZ causes these changes in mice and that the administration of plant-derived treatments partially reverses them. The alterations that the mice with CPZ manifested in the Irwin Test agree with what was observed in the open field test (OFT), which is widely used to measure the spontaneous motor behavior of rodents associated with arousal or inhibition of the locomotor system. In addition, the assay has been validated to measure anxiety-like effects since the nature of rodents in a new environment is to seek protected spaces. In this case, the periphery (close to the box walls) represents security. At the same time, the center of the field is sensed as dangerous. Thus, the increase in the number of crossings in the periphery translates as a state of anxiety, while crossings in the center indicate a decrease in anxiety [37].

It can be deduced from these behaviors that CPZ can provoke changes associated with locomotion or anxiety, which are behavioral determinants when mice are exposed to the open field apparatus (OFT). Fluctuations in the animals' locomotion indicate alterations and could denote an abnormal function of the CNS. Another premise related to the behavioral changes observed in this trial is that they can be used to measure the general health of animals. Thus, the sick or stressed mice showed decreased motor capacity when exposed to the OFT but also showed increased grooming or rearing behaviors. Thus, it can be observed that the CPZ causes stress. With increased stress, it was observed that in the OFT, the mice preferred to remain close to the walls and travel more in the periphery area (thigmotaxis), a behavior that increases in situations of injury or stress.

Furthermore, remaining in the periphery is a sign of increased anxiety-like behavior; conversely, rats with low anxiety tend to spend more time in the center of the field area [38]. This behavior was observed in healthy mice during the experimentation in the present work. These behaviors are likely a consequence of the motor or cognitive damage that

CPZ generates by the demyelination of different CNS structures. In addition, it has been established that patients with progressive MS have overstimulation of the SNS due to chronic inflammation [35]. A study by Pérez Ortega et al. in 2016 demonstrated that extracts of different polarities from *T. lucida* had a sedative effect by reducing the spontaneous motor behavior of mice and an anxiolytic effect by interacting with the serotonergic and GABAergic neurotransmission system, attributing the possible effect to compounds identified as DF and flavonoids [18].

Grooming is an innate body-cleaning behavior found in healthy rodents but it can also show repetitive and stereotyped patterns due to CNS disorders such as stress and anxiety. Thus, the increase in grooming, hyperlocomotion, bristling hair, and piling indicate that the VEH group presented an overstimulation of the CNS and probable noradrenergic activation in the limbic system (corpus callosum, thalamus, hypothalamus, hippocampus, amygdala, midbrain), a system responsible for modulating emotions and behavior [35,36,39]. Regarding the ability to restore motor impairment and the emotionality parameters evaluated in the OFT, the most consistent results were observed in the mice treated with the extracts TIHx and TIAcOEt since they counteracted the effects of cuprizone on the six variables analyzed. The chemical composition of both treatments includes the significant presence of coumarins, to which the effects observed in both extracts could be attributed, at least in part. Each compound has a different activity level; thus, IC controls five of the six variables analyzed in the OFT, followed by PE > HN = SC > DF. The coumarins IC and HN are the less complex structures of the five analyzed here, both substituted in position 7, the first with an isoprenyl group and the other with only a methoxyl. If we consider both, it was observed that a more complex radical in that position is better at reversing the damage caused by CPZ; it was also observed that when the compound is more substituted in different positions, the activity in the OFT also decreased.

The effects of the extracts and compounds of *T. lucida* on variables in the OFT is related to their activity on the CNS; thus, for example, in 2015, an antidepressant effect of extracts and fractions of this plant on rats subjected to the forced swimming test was reported [21,23]. Recently, the antipsychotic capacity of the aqueous and ethyl acetate extracts was reported. In addition, the HN and DF obtained from this species, are antipsychotics, which was demonstrated in a model of acute psychosis induced by ketamine through quantifying motor behavior in OFT, depression in the forced swimming test, and memory in the passive avoidance test. In the same work, the interaction of these natural treatments with haloperidol was identified since a potentiation of catalepsy in mice induced by that drug was observed. The results of both trials indicate that these *T. lucida* products modify glutamatergic and dopaminergic neurotransmission; both are involved in the pathophysiology of neurological diseases such as schizophrenia [27]. This finding is interesting since ketamine, also used as an antidepressant, can reverse the effects caused by CPZ. For example, repeated treatment with (R)-ketamine (10 mg/kg/ daily, twice a week, for six weeks) significantly improved demyelination and activated microglia in the brain compared with saline-treated mice [40]. Thus, it can be deduced that *T. lucida* could be exerting its protective effect against the actions of cuprizone due to its ability to interact with the glutamatergic system as ketamine does [27], since the products of the plant interact with that drug. More studies are necessary to establish the relationship between this neurotransmission system and coumarins.

CPZ has been shown to induce behavioral deficits that correlate with the demyelination of different structures, suggesting that behavioral testing may serve as a valuable surrogate marker of the demyelinating event [41]. In 2008, Torkilds reported behavioral deficits in CPZ-treated animals from visual observations, indicating motor dysfunction within five weeks of CPZ treatment, which were monitored in the Rr test [16].

The results of the Rr test indicate that the VEH group has low resistance (strength), as well as a lack of balance and coordination, which could represent a peripheral nervous system (PNS) dysfunction, as well as demyelination in CNS structures such as the cerebellum or brainstem and the motor cortex. On the one hand, the cerebellum controls motor

force, balance, and coordination, and the brainstem allows communication between the brain and the spinal cord to send signals to the PNS; however, demyelination of these structures would cause communication dysfunction of the axons (synapses) [35,36]. While the locomotion of the groups treated with the SLM and PDN reference drugs and the *T. lucida* treatments differed from the VEH group, these behavioral results are consistent with the evaluations already carried out for this plant, indicating its importance as a treatment for CNS diseases. It should also be noted that the naturally occurring drug SLM, consisting of a mixture of flavonoids from *Silybum marianum*, has a significant effect as a neuroprotector in the CPZ model utilized in the present investigation. Furthermore, this drug has antiviral and anticancer activities, as well as antioxidant and anti-inflammatory effects, and contributes to improving the condition of other diseases such as Alzheimer's [42,43].

3.4. Evans Blue Extravasation

The CPZ modifies the behavior of the animals, simulating the demyelination that occurs during MS. One of the pathophysiological events that it triggers is an increase in the permeability of the blood–brain barrier (BBB) in such a way that the control exerted by the CPZ is altered [44]. Cerebral vasculature restricts the transport of molecules from the blood and CNS parenchyma [45]. Deterioration of the BBB is observed due to infiltration and activation of microglia, which can cause neuroinflammation with an increase in proinflammatory cytokines. Therefore, in this work, the level of extravasation was also measured using the Evans blue (EB) quantification technique in vivo after its intravenous injection. The EB dye has a high affinity for albumin, so this test is based on the fact that under basal physiological conditions, albumin does not cross the BBB [46]. However, under conditions of inflammation, blood vessels “extravasate” proteins, resulting in a blue coloration of tissues that have endothelial damage (increased permeability) [47].

In the present work, it was shown that the administration of CPZ (VEH group) allows EB extravasation, indicating an increase in permeability, as has been indicated in the literature [44], which may be due in part to the inflammatory process and the oxidative stress generated in response to oligodendrocyte apoptosis [3]. Apoptosis leads to the release of various cytokines and chemokines that activate other cells, such as astrocytes and microglia, generating a pro-inflammatory environment [14].

The structural composition of the BBB is complex, which makes it possible to protect the brain from exposure to immune cells, neurotoxic substances derived from endogenous metabolites, proteins, or xenobiotics from the environment. For this reason, an alteration in the permeability of the BBB is associated with different stimuli, including inflammation, OXE, and traumatic stress. The present work showed that the treatments of *T. lucida*, SLM, and PDN behaved as neuroprotectors. Furthermore, another research group recently published a paper on a chemical fraction obtained from *T. lucida*. The researchers standardized the content of the five coumarins evaluated here, demonstrating that the 10 mg/kg dose of the said treatment protects the BBB in mice with a toxic stimulus of LPS by decreasing the extravasation of EB [32]. In the case of PDN, an anti-inflammatory drug from the group of glucocorticoids that also acts as an immunosuppressant, inhibiting the activity of phospholipase A2 consequently decreases the release of arachidonic acid from the phospholipids of cell membranes. This action prevents the formation of prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes. It also inhibits the migration of neutrophils to areas of inflammation, capillary permeability, edema, and the accumulation of mast cells associated with the release of histamine [48]. However, long-term administration of PDN can cause side effects such as kidney damage, depression, anxiety, dementia, and osteoporosis, which could further contribute to the deterioration of the patient with MS. Cellular experiments have also shown that silymarin can inhibit a variety of inflammation-related signaling pathways (such as the NF-κB pathway) [42]. Although there are no data on the reno-protective effect of *T. lucida*, it was observed in this work that the treatments derived from the plant, except for HN, can exert an effect leading to a reduction in extravasation in these organs (right and

left kidneys). For example, it was shown that SC protects the myocardium from ischemia by inhibiting OXE and cell apoptosis [49].

3.5. Cytokines as a Measure of Neuroinflammation

For a long time, it has been observed that consuming CPZ through food induces demyelination of brain structures due to the death of oligodendrocytes. However, how this phenomenon occurs still needs to be clarified. Zirngibl et al. have proposed two possible mechanisms of action for CPZ demyelination. The first is that the damage generated in oligodendrocytes is caused by mitochondrial dysfunction or reduced myelin synthesis, a mechanism called “intrinsic cell damage” [3]. It is well known that CPZ causes mitochondrial abnormalities in mouse liver by inducing mitochondrial enlargement. This severely alters the metabolic rate as well as oxidative phosphorylation by reducing mitochondrial enzymes that contain copper as a cofactor (monoamine oxidase and cytochrome c (Cyt c) oxidase [50,51]. The second mechanism consists of damage to oligodendrocytes by inflammatory molecules resident cells in the brain, such as oligodendrocytes, astrocytes and microglia, or peripheral immune cells neutrophils or T cells; thus, this mode of action is called “Extrinsic cell damage” [3]. This second mechanism proposed by Zirngibl et al. involves a complex immune response. It has been observed that there are almost T cells present during CPZ administration, which is why it is believed that there is no involvement in the BBB [14].

Recently, Kaddatz et al. found reduced numbers of cytotoxic CD8+ T and even fewer CD4 T cells accumulated within the corpus callosum of CPZ-treated mice up to week 5 [52,53]. It has been proposed that the effect of cuprizone on demyelination in the CNS is partly due to the increase in TNF- α and its cytotoxic effect on oligodendrocyte cells [54]. Most likely, the ability of *T. lucida* to block the actions of CPZ could be associated with its immunomodulatory effect on TNF- α and IL-1 β (Figure 5, panels c and d), two cytokines that are relevant in the development of MS [12].

It is known that during the development of MS, autoreactive T cells are activated in the periphery by a systemic or local factor through a mechanism of molecular mimicry (epitopes shared by the CNS autoantigen) and possibly infectious agents. These activated CD4+ T lymphocytes acquire the ability to cross the CNS by encountering an antigen-presenting cell (DC, macrophage, or microglia) that expresses MHC-II on its surface, which when stimulated, acquires a type 1 (Th1) phenotype and produces Proinflammatory ILs (TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, and IL-12) and chemokines. These induce clonal proliferation of T lymphocytes and activate macrophages and microglia, producing an increase in the expression of molecules of endothelial adhesion, increasing the permeability of the BBB and allowing a high passage of mononuclear cells [11,53,55]. Macrophages and microglia secrete neurotoxic mediators such as TNF- α , nitric oxide (NO), MMPs, and ROS, contributing to myelin and axon damage [55]. Also, during the development of MS, there are type 2 helper T lymphocytes (Th2) that release anti-inflammatory ILs (IL-4, IL-5, IL10, and IL-13) that try to decrease the proinflammatory state. The results of our evaluation suggest that TIHx exerts an immunomodulatory effect by increasing the production of anti-inflammatory ILs such as IL-4 and IL-10 (Figure 5a,b). The evaluation of the anti-inflammatory effect of *T. lucida* indicated that of the two extracts evaluated, TIHx had the greatest effect, with 92.7% inhibition of edema in mouse ears, indicating a possible mechanism of action on the inhibition of COX2 [21]. The results with TIHx and TIACOEt indicate the possible synergy of the five compounds contained in these treatments since the extracts turned out to have a larger effect, not only immunomodulatory but also in all the parameters evaluated.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

T. lucida was acquired through local producers in the municipality of Xochitepec in Morelos, Mexico, in September 2020. One specimen was sent to the herbarium of the Ethnobotanical Garden, Cuernavaca, Morelos, Mexico (Instituto Nacional de Antropología

e Historia), for taxonomic classification (INAH-2086) by the Master of Science Margarita Áviléz and Macrina Fuentes. The plant material (flowers, leaves, and stems) was kept away from light and allowed to dry in the shade for three weeks at room temperature. Subsequently, the plant was pulverized in an electric pulvex mill (Büchi R-114, Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland) until particles of 4 to 6 mm were obtained.

4.2. Preparation of Extracts

A total of 9.0 kg of plant material was used. It was first placed in a 20 L transparent glass container for three complete sequential extractions by maceration with hexane (Hx) at a concentration of 1:2 (weight/volume) for 24 h at room temperature. Afterward, it was distilled under reduced pressure in a rotary evaporator for subsequent freeze-drying. To obtain the ethyl acetate extract (TlAcOEt), we repeated the extraction procedure with AcOEt.

4.3. Isolation and Identification of Five Coumarins

For the isolation and identification of the five coumarins, the *T. lucida* extracts were fractionated using the open column chromatography technique (200 × 600 mm), utilizing a column previously packed with silica gel 60 (109,385, Merck) and a gradient system Hx/ethyl acetate (AcOEt) as the mobile phase. We started with a system of 100% Hx, followed by Hx/AcOEt at proportions of 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, and 100% AcOEt. The column was finally washed with 100% MeOH. The system proportion was changed every five fractions (F) of 300 mL collected. At the end and according to their chemical profile by thin layer chromatography (TLC), the fractions were mixed and analyzed by HPLC (Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic separation of TlHx and TlAcOEt allowed the isolation and identification of five bioactive coumarins; three of these coumarins (DF, HN, and SC) have already been reported by other authors [18,25], and two (IC and PE) were reported for the first time in 2020 [25].

4.4. HPLC Analysis of Extracts and Coumarins of *T. lucida*

The chromatographic analysis was performed using an HPLC system with a 2996 Separation module and a photodiode array detector and analyzed using the Empower 3 software. Chemical separation was achieved using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm × 250 mm i.d., 5- μ m particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). The mobile phase comprised a trifluoroacetic acid aqueous solution of 0.5% (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient system was as follows: 0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 14–15 min; 24–25 min, 80% B; 26–27 min, 100% B; and 28–30 min, 0% B. The flow rate was maintained at 0.9 mL min⁻¹, and the sample injection volume was 10 μ L. Absorbance was measured at 330 nm. Compared with the standards, the compounds were identified by their UV spectra and retention times (RT). After the identification of the compounds, standardization of the extracts was carried out for their coumarin content, for which a standard curve of each coumarin was built with an initial concentration of 40 μ g/mL followed by 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 and 0.156. μ g/mL. Each sample was injected into the HPLC, and the chromatograms obtained were observed at a wavelength of 330 nm. The AUC of the peaks obtained was integrated to generate the equation $y = mx + b$, considering $R^2 = 0.99$ to 1 as adequate. The results obtained determined the concentration in μ g/mg of extract by coumarin [32].

4.5. Animals

Male BALB/c mice (10-week-old) obtained from our animal facilities were used. Eleven groups of fifteen mice each were housed and maintained under pathogen-free conditions in the animal facility at the Southern Biomedical Research Center of the Mexican Institute of Social Security (IMSS) under constant temperature (21–23 °C) and humidity (45–50%) conditions, with a 12 h light/dark cycle and free access to water and standard food. All the experiments followed the guidelines in the National Institutes of Health Guide

for the Care and Use of Laboratory Animals, and experimental protocols were reviewed. For the euthanasia of the mice, the overdose technique with sodium pentobarbital was selected, which is accepted by the official Mexican Norm with the number NOM-062-ZOO-1999 (Technical specifications for the production, care, and use of animals from the laboratory). Furthermore, the experimental protocol was authorized by the local Health Research Committee IMSS, with approval number: R-2020-1702-073.

4.6. Model of Deteriorous Behavior, Motor Damage and Neuroinflammation Induced with Cuprizone

For five weeks, motor damage was induced through the forced administration of CPZ (Sigma Aldrich- C9012) 40 mg/kg (VEH, damage group) using 1% tween 20 as a diluent. Eleven groups were formed.

1. Healthy mice were treated with Tween 20 at 1% only. The remaining groups were treated with CPZ (Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone, daily for five weeks), either alone or co-administered at the end of week 2 with the respective treatments by the oral pathway.
2. Damage group (VEH, Tween 20 at 1%).
3. Sylimarin (SLM, 200 mg/kg).
4. Prednisone (PDN, 2 mg/kg).

There were seven treatments based on *T. lucida*.

5. Isoprenyloxycumarin (IC, 25 mg/kg).
6. Herniarin (HN, 25 mg/kg).
7. 7-O-prenyl-scopoletin (PE, 25 mg/kg).
8. Dimethylfraxetin (DF, 25 mg/kg).
9. Scoporone (SC, 25 mg/kg).
10. TIHx (25 mg/kg).
11. TlAcOEt (25 mg/kg).

Furthermore, all treatments were diluted in Tween 20 at 1% and administered by oral pathway for 3 weeks. Every third day, from the first administration, the Irwin test observations performed. At the end of each week, the “rota rod” (motor skills) test was performed, and at the end of week 5, the open field evaluation test. After this, the animals were sacrificed to obtain the target organs.

4.7. Behavioral Activity

4.7.1. The Irwin Test

This test was performed at three points in the procedure: (1) when there was no disturbance of the cage or handling of the animal, (2) during handling of the animal and administration of CPZ or the treatment, and (3) in the first 15 min after administration. The animals in each group were evaluated for the presence or absence of any behavioral symptoms or physiological manifestations three days per week; the parameters evaluated are shown in Table 4 [33].

Table 4. Parameters observed during the Irwin Test.

Undisturbed Observations		Animal Handling		After Administration	
a	Writhing	f	Abdominal tone	n	Crowding
b	Jumping	g	Limb tone	o	Ataxia
c	Tremor	h	Pupil size	p	Increased locomotion
d	Convulsion	i	Visual placement	q	No exploration
e	Raised hair	j	Lacrimation		
		k	Salivation		
		m	Diarrhea		

4.7.2. Rota-Rod Test

Motor coordination was evaluated using the rota-rod test, performed at the end of each week. The rota-rod device comprised a 3 cm diameter rotating rod divided into five 6 cm wide tracks, a time detector that stopped when the mouse landed on the track, and software that recorded the time spent on the rod. For each animal, the time spent on the rod was evaluated for 5 min. Each minute, the speed increased, i.e., the first minute = 4 RPM, minute two = 12 RPM, minute three = 20 RPM, minute four = 28 RPM, and minute five = 36 RPM. The results were calculated by integrating the AUC of the five experimental weeks.

4.7.3. Open Field Test (OFT)

The open field test was used to evaluate the exploratory activity of the animal. The OFT comprised an acrylic box (transparent walls and black floor, 30 × 30 × 15 cm) divided into nine squares of equal area. Each mouse was placed in the box, and the behavior was videotaped for 5 min under red light for analysis. The parameters measured were the number of times that the animal crossed the quadrats posing on all four legs, which was classified as total number of crossings (TC), the number of crossings to the periphery (CP), and the number of crossings to the center (CC). The number of rearing (R) and grooming (G) behaviors was also observed, as was the number of stools. The test was performed at the end of week 5.

4.8. Measure of Vascular Permeability with Extravasation of Evans Blue Test

To measure vascular permeability in mice with motor damage induced with CPZ, an intravenous injection of Evans blue (EB) was performed. A sterile 0.5% EB solution was prepared in PBS (the solution was filter-sterilized to remove undissolved particles), and 200 µL was injected into the tail vein of the mouse. After 1 h, the mice were sacrificed to obtain the brain, spleen, and right and left kidneys. The organs of interest were obtained, weighed, and collocated in 500 µL of formamide. All tubes containing the samples were placed in a water bath at 55 °C and incubated for 24 h to extract EB from the tissue. After that time, the tubes were centrifuged (10 min, at 14,000 RPM) to sediment the remaining tissue fragments. The absorbance was measured at 630 nm, using 500 µL of formamide as a blank. Data were calculated using the EB extinction coefficient $\epsilon = 7.81 \times 10^4$ [56].

4.9. Cytokine Quantification by ELISA

The brains were macerated in a frozen mortar with ice-cold PBS-PMSF (0.1%) 1:5 *w/v*. The suspensions were centrifuged at 14,000 RPM for 7 min and the supernatants were used to determine the concentration of cytokines by ELISA, following the manufacturer's instructions. Mouse IL-1 β , IL-4, IL-10, and TNF α ELISA kits were purchased from OptEIA™ BD.

Briefly, 96-well flat-bottomed ELISA plates were coated with the respective capture antibody and incubated overnight at 4 °C. Non-specific binding sites were blocked by incubating for 30 min at RT with PBS-5% fetal bovine serum (FBS). Next, the sample was added and incubated for 2 h at room temperature. Then, the plates were incubated with the corresponding detection anti-cytokine-HRP antibodies for 30 min at room temperature. Bound complexes were detected by reaction with tetramethylbenzidine substrate after 30 min incubation in the dark. The reaction was stopped with H₂SO₄ 2 N and the absorbance was measured at 490 nm at 37 °C in a VERSAmix ELISA plate reader (Molecular Devices). The cytokine concentration was calculated according to standard curves for each cytokine and reported as pg/mg protein.

4.10. Statistics

The data were analyzed using InStat (GraphPad, San Diego, CA, USA) and expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA was used to compare groups or treatments with a Tukey test for Rr and quantification of ILs. Dunnet Test was used to analyze OFT, and a student

t-test for extravasation of EB. The Chi-square test from Excel was used for the relativized behavior results in the Irwin test. Differences were considered significant when $* p < 0.05$, compared with the VEH group, for all assays.

5. Conclusions

The results presented here allow us to conclude that the extracts and five coumarins (dimethylfraxetine, 7-O-prenylscopoletin, 7-isoprenyloxycoumarin, herniarin, and scoporone) from *T. lucida* may have pharmacological effects for controlling motor impairment, behavioral impairment and systemic inflammation. At the level of the central nervous system, they can provide protection against tissue damage caused by increased vascular permeability, mainly due to protection of the BBB, in mice with experimental encephalomyelitis induced with CPZ.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph16101391/s1>, Data S1: NMR of IC, Data S2: NRM of HN, Data S3: NRM of PE, Data S4: NRM of DF, and Data S5: NRM of SC. Figure S1: Standardization chromatogram and UV spectra of IC; Figure S2: Standardization chromatogram and UV spectra of HN; Figure S3: Standardization chromatogram and UV spectra of PE, Figure S4: Standardization chromatogram and UV spectra of DF; and Figure S5: Standardization chromatogram and UV spectra of SC. Table S1: ANOVA test of OFT; Table S2: ANOVA test of Rr; Table S3: ANOVA test of EB; and Table S4: ANOVA test of ILs.

Author Contributions: M.H.-R., G.C.-M. and E.J.-F. conceived and designed the experiments; G.C.-M. and M.H.-R. analyzed the biological data; M.H.-R., G.C.-M. and J.C.A.P. conducted the investigation; M.G.-C. and G.C.-M. performed the chemical experiments; M.H.-R., E.J.-F., S.L.P.-D. and G.C.-M. contributed to writing—review and editing; M.H.-R., E.J.-F. and J.C.A.P. provided project administration; M.H.-R. and E.J.-F. contributed to funding acquisition; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This Project was supported by the Health Research Coordination of the Mexican Institute of Social Security (IMSS) with the number FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/108 to M.H.-R.

Institutional Review Board Statement: This protocol was registered with the Local Health Research Committee 1702 and Ethics Committee of the Mexican Social Security Institute, under number: R-2020-1702-073.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No electronic file with the data supporting the results presented is available, but the data are included in specific attachments as Supplementary Data. Samples of the compounds: then 7-Isoprenyloxycoumarin (IC) is more concentrated in the less polar extract (TIHx). At the same time, Herniarin (HN)), Dimethylfraxetin (DF), Scoporone (SC), and 7-O-prenylscopoletin (PE), are available from the authors.

Acknowledgments: G.C.-M. is grateful for the fellowship from CONACyT (74031) for their Ph.D. studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Peng, Y.; Zhu, F.Z.; Chen, Z.X.; Zhou, J.X.; Gan, L.; Yang, S.S.; Gao, S.; Liu, Q.Q. Characterization of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)35-55-specific CD8+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Chin. Med. J.* **2019**, *132*, 2934–2940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Baecher-allan, C.; Kaskow, B.J.; Weiner, H.L. Review Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* **2018**, *97*, 742–768. [[CrossRef](#)]
3. Zirngibl, M.; Assinck, P.; Sizov, A.; Caprariello, A.V.; Plemel, J.R. Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: An updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Mol. Neurodegener.* **2022**, *17*, 34. [[CrossRef](#)]
4. Castillo-Álvarez, F.; Marzo-Sola, M.E. Role of intestinal microbiota in the development of multiple sclerosis. *Neurología* **2017**, *32*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Terry, R.L.; Ifergan, I.; Miller, S.D. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1304*, 145–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. LaMothe, R.A.; Kolte, P.N.; Vo, T.; Ferrari, J.D.; Gelsing, T.C.; Wong, J.; Chan, V.T.; Ahmed, S.; Srinivasan, A.; Deitemeyer, P.; et al. Tolerogenic nanoparticles induce antigen-specific regulatory T cells and provide therapeutic efficacy and transferrable tolerance against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 281. [[CrossRef](#)]
7. Macías-Cosme, K.; Cervantes-Llanos, M.; Marín-Prida, J.; Falcón-Cama, V.; Pentón-Arias, E.; Pentón-Rol, G. Generation of a murine chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis model for molecular pharmacology studies in multiple sclerosis. *Biotechnol. Appl.* **2012**, *29*, 162–168.
8. Constantinescu, C.S.; Farooqi, N.; O'Brien, K.; Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 1079–1106. [[CrossRef](#)]
9. Blaschek, A.; Karenfort, M.; Schimmel, M.; Pritsch, M.; Storm, K.; Gravesande, V.; Weber, M.; Schmoeger, M.; Seidl, R.; Prayer, D.; et al. Clinical and magnetic resonance imaging features of children, adolescents, and adults with a clinically isolated syndrome. *SC. Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2018**, *22*, 1087–1094. [[CrossRef](#)]
10. García-Díaz, B.; Estivill-Torrús, G. Modelos de experimentación animal para la investigación en esclerosis múltiple. *Rev. Española Escler. Mult.* **2008**, *1*, 5–9.
11. Wootla, B.; Eriguchi, M.; Rodriguez, M. Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune Dis.* **2012**, *2012*, 969657. [[CrossRef](#)]
12. Barthelmes, J.; Tafferter, N.; Kurz, J.; de Bruin, N.; Parnham, M.J.; Geisslinger, G.; Schiffmann, S. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and evaluation of the disease-dependent distribution of immune cells in various tissues. *J. Vis. Exp.* **2016**, *2016*, 53933. [[CrossRef](#)]
13. Torre-Fuentes, L.; Moreno-Jiménez, L.; Pytel, V.; Matías-Guiu, J.A.; Gómez-Pinedo, U.; Matías-Guiu, J. Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurología* **2019**, *35*, 32–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhan, J.; Mann, T.; Joost, S.; Behrangi, N.; Frank, M.; Kipp, M. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells* **2020**, *9*, 843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gudi, V.; Gingele, S.; Skripuletz, T.; Stangel, M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 73. [[CrossRef](#)]
16. Torkildsen, Ø.; Brunborg, L.A.; Myhr, K.M.; Bø, L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol. Scand.* **2008**, *117*, 72–76. [[CrossRef](#)]
17. González-Trujano, M.E.; Gutiérrez-Valentino, C.; Hernández-Arámburo, M.Y.; Díaz-Reval, M.I.; Pellicer, F. Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the antinociceptive activity of *Tagetes lucida* Cav. *Life Sci.* **2019**, *231*, 116523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pérez-Ortega, G.; González-Trujano, M.E.; Ángeles-López, G.E.; Brindis, F.; Vibrans, H.; Reyes-Chilpa, R. *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *181*, 221–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Capunzo, M.; Brunetti, L.; Cavallo, P.; Boccia, G.; Caro, F.D.E.; Ieluzzi, M. Antimicrobial activity of dry extracts of *Tagetes lucida* from Guatemala. *J. Prev. Medicine Hyg.* **2003**, *44*, 85–87. [[CrossRef](#)]
20. Adams, M.; Gmünder, F.; Hamburger, M. Plants traditionally used in age related brain disorders-A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 363–381. [[CrossRef](#)]
21. Guadarrama-Cruz, G.; Alarcon-Aguilar, F.J.; Lezama-Velasco, R.; Vazquez-Palacios, G.; Bonilla-Jaime, H. Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 277–281. [[CrossRef](#)]
22. Guzmán Gutiérrez, S.L.G.; Reyes Chilpa, R.R.; Bonilla Jaime, H. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, *24*, 591–608. [[CrossRef](#)]
23. Bonilla-Jaime, H.; Guadarrama-Cruz, G.; Alarcon-Aguilar, F.J.; Limón-Morales, O.; Vazquez-Palacios, G. Antidepressant-like activity of *Tagetes lucida* Cav. is mediated by 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *J. Nat. Med.* **2015**, *69*, 463–470. [[CrossRef](#)]
24. Malik, A.; Kushnoor, A.; Saini, V.; Singhal, S.; Kumar, S.; Yadav, Y.C. In vitro antioxidant properties of Scopoletin. *J. Chem. Pharm. Res.* **2011**, *3*, 659–665.
25. Monterrosas-brisson, N.; Herrera-ruiz, M.; Jiménez-ferrer, E.; Bahena-pérez, R.; Avilés-flores, M.; Fuentes-mata, M.; Martínez-duncker, I.; González-cortazar, M.; Avilés-flores, M.; Fuentes-mata, M.; et al. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 3244–3248. [[CrossRef](#)]
26. Sandra Lilliana, P.D.; Manasés, G.C.; Enrique, J.F.; Rubén, R.R.; Cinthya, B.P.; Belen, M.H.G.; Alejandro, Z.; Maribel, H.R. Isolation, chemical characterization, and anti-inflammatory activity of coumarins, flavonoids, and terpenes from *Tagetes lucida*. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36*, 4751–4756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Porrás-Dávila, S.L.; Jiménez-Ferrer, E.; Román Ramos, R.; González-Cortazar, M.; Almanza-Pérez, J.C.; Herrera-Ruiz, M. Herniarin, Dimethylfraxetin and Extracts from *Tagetes lucida*, in Psychosis Secondary to Ketamine and Its Interaction with Haloperidol. *Plants* **2022**, *11*, 2789. [[CrossRef](#)]
28. Lilliana Porrás-Dávila, S.; Zamilpa, A.; Jiménez-Ferrer, E.; Jiménez-Aparicio, A.; Alejandra Santillan-Urquiza, M.; Díaz-Patricio, F.; Herrera-Ruiz, M. Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects of Standardized Fractions in Herniarin and Daphnoretin from *Distictis buccinatoria*. *Chem. Biodivers* **2023**, *20*, e202200969. [[CrossRef](#)]

29. Hernández, T.; Canales, M.; Flores, C.; García, A.M.; Durán, A.; Avila, J.G. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharm Biol.* **2006**, *44*, 19–22. [[CrossRef](#)]
30. Chaves, O.S.; Teles, Y.C.F.; De Oliveira Monteiro, M.M.; Mendes, L.D.G., Jr.; De Fátima Agra, M.; De Andrade Braga, V.; Silva, T.M.S.; de Fátima Vanderlei de Souza, M. Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoquinoline alkaloids. *Molecules* **2017**, *22*, 94. [[CrossRef](#)]
31. Bubols, G.B.; Vianna, D.d.R.; Medina-Remón, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R.M.; Eifler-Lima, V.L.; Garcia, S.C. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 318–334. [[PubMed](#)]
32. Santibáñez, A.; Herrera-Ruiz, M.; González-Cortazar, M.; Nicasio-Torres, P.; Sharma, A.; Jiménez-Ferrer, E. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Coumarins from *Tagetes lucida* in an LPS-Induced Neuroinflammation Model. *Plants* **2022**, *11*, 2805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kopanitsa, M.V.; Lehtimäki, K.K.; Forsman, M.; Suhonen, A.; Koponen, J.; Piipponniemi, T.O.; Kärkkäinen, A.M.; Pavlidi, P.; Shatillo, A.; Sweeney, P.J.; et al. Cognitive disturbances in the cuprizone model of multiple sclerosis. *Genes Brain Behav.* **2021**, *20*, e12663. [[CrossRef](#)]
34. Mathiasen, J.R.; Moser, V.C. The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2018**, *83*, e43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. McPhetres, J.; Zickfeld, J.H. The physiological study of emotional piloerection: A systematic review and guide for future research. *Int. J. Psychophysiol.* **2022**, *179*, 6–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sternberg, Z. Sympathetic Nervous System Dysfunction in Multiple Sclerosis, Linking Neurodegeneration to a Reduced Response to Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1635–1644. [[CrossRef](#)]
37. Andrade, J.C.; Monteiro, Á.B.; Andrade, H.H.N.; Gonzaga, T.K.S.N.; Silva, P.R.; Alves, D.N.; Castro, R.D.; Maia, M.S.; Scotti, M.T.; Sousa, D.P.; et al. Involvement of GABA A Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal. *BioMed Res. Int.* **2021**, *2021*, 9929805. [[CrossRef](#)]
38. Kraeuter, A.K.; Guest, P.C.; Sarnyai, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-like Behavior. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1916*, 99–103. [[CrossRef](#)]
39. Liu, H.; Huang, X.; Xu, J.; Mao, H.; Li, Y.; Ren, K.; Ma, G.; Xue, Q.; Tao, H.; Wu, S.; et al. Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. *Neurobiol. Stress* **2021**, *15*, 100417. [[CrossRef](#)]
40. Wang, X.; Chang, L.; Wan, X.; Tan, Y.; Qu, Y.; Shan, J.; Yang, Y.; Ma, L.; Hashimoto, K. (R)-ketamine ameliorates demyelination and facilitates remyelination in cuprizone-treated mice: A role of gut-microbiota-brain axis. *Neurobiol. Dis.* **2022**, *165*, 105635. [[CrossRef](#)]
41. Franco-Pons, N.; Torrente, M.; Colomina, M.T.; Vilella, E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol. Lett.* **2007**, *169*, 205–213. [[CrossRef](#)]
42. Guo, H.; Cao, H.; Cui, X.; Zheng, W.; Wang, S.; Yu, J.; Chen, Z. Silymarin's inhibition and treatment effects for Alzheimer's disease. *Molecules* **2019**, *24*, 1748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kren, V.; Walterová, D. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **2005**, *149*, 29–41. [[CrossRef](#)]
44. Berghoff, S.A.; Düking, T.; Spieth, L.; Winchenbach, J.; Stumpf, S.K.; Gerndt, N.; Kusch, K.; Ruhwedel, T.; Möbius, W.; Saher, G. Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model. *Acta Neuropathol. Commun.* **2017**, *5*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Radu, M.; Chernoff, J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J. Vis. Exp.* **2013**, *73*, e50062. [[CrossRef](#)]
47. Goldim, M.P.d.S.; Della Giustina, A.; Petronilho, F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Curr. Protoc. Immunol.* **2019**, *126*, e83. [[CrossRef](#)]
48. Krasselt, M.; Baerwald, C. Efficacy and safety of modified-release prednisone in patients with rheumatoid arthritis. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 1047–1058. [[CrossRef](#)]
49. Wan, C.; Wei, Y.; Ma, J.; Geng, X. Protective effects of scoparone against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 1752–1760. [[CrossRef](#)]
50. Suzuki, K. Giant hepatic mitochondria: Production in mice fed with cuprizone. *Science* **1969**, *163*, 81–82. [[CrossRef](#)]
51. Kesterson, J.W.; Carlton, W.W. Monoamine oxidase inhibition and the activity of other oxidative enzymes in the brains of mice fed cuprizone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1971**, *20*, 386–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kaddatz, H.; Joost, S.; Nedelcu, J.; Chrzanowski, U.; Schmitz, C.; Gingele, S.; Gudi, V.; Stangel, M.; Zhan, J.; Santrau, E.; et al. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia* **2021**, *69*, 925–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Slavin, A.; Ewing, C.; Liu, J.; Ichikawa, M.; Slavin, J.; Bernard, C.C.A. Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Autoimmunity* **1998**, *28*, 109–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pasquini, L.A.; Calatayud, C.A.; Bertone Uña, A.L.; Millet, V.; Pasquini, J.M.; Soto, E.F. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 279–292. [[CrossRef](#)]

55. Miller, S.D.; Karpus, W.J.; Davidson, T.S. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr. Protoc. Immunol.* **2010**, *88*, 15.1.1–15.1.20. [[CrossRef](#)]
56. Honeycutt, S.E.; O'Brien, L.L. Injection of Evans blue dye to fluorescently label and image intact vasculature. *Biotechniques* **2020**, *70*, 181–185. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00156

Matrícula: 2202800915

Evaluación del efecto neuroprotector e inmunomodulador de *Tagetes lucida* en el modelo murino de desmielinización inducido por cuprizona.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 10 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ
DRA. MAYRA AEJANDRA SANTILLAN URQUIZA
DRA. ELIAN YURITZI ALEGRIA HERRERA
DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: GABRIELA CASTRO MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



GABRIELA CASTRO MARTINEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

VOCAL

DRA. MAYRA AEJANDRA SANTILLAN
URQUIZA

VOCAL

DRA. ELIAN YURITZI ALEGRIA HERRERA

SECRETARIO

DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER